

Treball Final de Grau

Estudi: Grau en Innovació i Seguretat Alimentària

Títol: La lactasa i la seva aplicació a la indústria alimentària

Document: Memòria

Alumne: Clara Espinosa Sobrado

Tutor: Maria Elena Saguer Hom

Departament: Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia
Alimentària

Àrea: Tecnologia dels Aliments

Convocatòria (mes/any): 06/2023

Tabla de contenido

1. Resum	4
2. Agraïments.....	7
3. Introducció.....	8
4. Material i mètodes	10
5. Introducció sobre enzims.....	12
5.1 Fonaments.....	12
5.2 Enzims i cinètica enzimàtica	13
5.2.1 Enzims.....	13
5.2.2 Classificació dels enzims.....	15
5.2.3 Inhibició enzimàtica	16
5.2.4 Cinètica enzimàtica	18
5.2.5 Efecte de les condicions del medi sobre l'activitat enzimàtica.....	21
6. La lactosa.....	23
6.1 Procés bioquímic de la síntesi de la lactosa a la glàndula mamària.....	24
6.2 Absorció i destinació dels productes de la digestió de la lactosa	24
6.3 Fisiopatologia de la lactosa.....	26
6.4 La lactosa a la indústria alimentària	28
6.5 Obtenció de lactosa per a aplicacions dins la indústria alimentària.....	31
6.6 Alternatives a l'ús de lactosa en la formulació d'aliments	32
6.7 El creixement actual del mercat de productes sense lactosa.....	33
7. Lactasa	35
7.1 L'ús de la lactasa en l'àmbit industrial.....	39
7.1.1 Tecnologia de producció industrial de lactasa	39
7.1.2 Tecnologia d'immobilització de lactasa.....	46
7.2 Aplicació de la lactasa en la indústria alimentària	50
8. Problemes: intolerància i al·lèrgia.....	57
8.1 Intolerància a la lactosa	58
8.1.1 Fenotips i genotips	59
8.1.2 Com es diagnostica la intolerància a la lactosa.....	62
8.1.3 Tractaments para la intolerància a la lactosa.....	63
8.2 Al·lèrgia a les proteïnes de la llet.....	65
9. Legislació.....	65

10.	<i>Conclusions</i>	70
11.	<i>Bibliografia</i>	75

1. Resum

Des de l'inici de la vida, es troben a la natura molècules que exerceixen un paper fonamental en les reaccions bioquímiques essencials per a la vida les quals es coneixen amb el nom d'enzims. Aquestes molècules són els catalitzadors més eficients que es coneixen, ja que incrementen la velocitat de les reaccions, fent que aquestes arribin a ser possibles.

Diferents factors han promogut un interès creixent per estudiar i comprendre els enzims, ja que tenen un paper crucial en una àmplia gamma d'aplicacions en diferents sectors; entre ells, la indústria alimentària, tant per a l'obtenció de matèries primeres com per a l'elaboració de productes. Per això, l'estudi d'aquests és molt rellevant en l'àmbit de la Tecnologia dels Aliments. Així, en la indústria làctica, els enzims són indispensables per a l'elaboració de la major part dels derivats de la llet que es consumeixen de forma habitual, i sobretot per a la producció d'aliments lliures de lactosa; aliments, que són aptes per aquella part de la població que és intolerant a aquest component, anomenat "sucre de la llet". En comprendre com funcionen els enzims i com es poden modificar per millorar-ne l'eficiència, la indústria pot optimitzar els seus processos, desenvolupar productes de millor qualitat i incrementar la disponibilitat de productes.

Aquest treball ofereix una recopilació sobre la informació més rellevant sobre l'ús de la lactasa als aliments. Primerament, hi ha un petit apartat per contextualitzar què són els enzims i perquè són tan importants en les reaccions bioquímiques. Es troben descrits alguns models que es basen en la llei d'acció de masses i poden incloure equacions com l'equació de Michaelis-Menten i l'equació de Lineweaver-Burk, per entendre la cinètica enzimàtica i com afecta la presència d'aquests catalitzadors. Seguidament, es tracta la lactosa. Es fa una breu descripció de les seves característiques, una explicació sobre el seu procés de biosíntesi i el destí dels productes una vegada digerits. Les seves propietats també són un factor rellevant a tenir en compte per al desenvolupament de productes d'alta qualitat. Per això, s'aprofundeix en les alternatives per a la seva incorporació en la formulació d'aliments, intentant potenciar els efectes beneficiosos i minimitzant l'impacte negatiu que puguin tenir.

A continuació s'aprofundeix en la lactasa, l'enzim encarregat de la descomposició de la lactosa en glucosa i galactosa. La lactasa està codificada per un sol gen, el gen LCT, i s'ha observat que la capacitat de digerir o no la lactosa a l'edat adulta és deguda a mutacions en l'expressió gènica del gen esmentat, que s'hereten de manera dominant o recessiva. Quan hi ha una deficiència de lactasa a causa de mutacions al gen LCT, la lactosa no pot ser adequadament descomposta a l'intestí prim, cosa que porta a la seva malabsorció. Com a resultat, la lactosa no absorbida arriba a l'intestí gruixut, on és fermentada pels bacteris intestinals, i es produeixen símptomes com gasos, inflamació abdominal, dolor, diarrea i altres malestars digestius.

La intolerància a la lactosa, per la seva banda, ha suscitat un gran interès dins de la comunitat científica, ja que es considera un problema de salut d'abast mundial. Afecta una gran part de la població i té un impacte significatiu en la qualitat de vida dels individus afectats. L'aplicació de la lactasa a la indústria ha permès la producció d'una àmplia gamma de productes lactis i no lactis aptes per a persones intolerants, ampliant així el mercat i oferint alternatives alimentàries atractives. El seu diagnòstic, juntament amb els tractaments per aquest problema, també hi són presents en aquest treball.

Per a la producció de lactasa en l'àmbit industrial, s'utilitzen diversos microorganismes, especialment bacteris i llevats. *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*, són exemples de microorganismes que produeixen lactasa. Durant els darrers anys, *E. coli* i *B. subtilis* han estat modificats genèticament per produir lactasa de manera més eficient, introduint gens específics d'altres microorganismes que naturalment produeixen lactasa al genoma del microorganisme recombinant, els quals acaben codificant per a l'enzim lactasa. El desenvolupament de fonts per a produir enzims d'ús en la indústria alimentària, amb mètodes d'aïllament, purificació i disseny de reactors enzimàtics, ha evolucionat de manera considerable a causa de la creixent demanda d'aliments que requereixen l'aplicació d'aquests compostos.

Posteriorment, es realitza una revisió dels mètodes actuals d'ús d'enzims, com seria la immobilització enzimàtica, la qual permet la reutilització i millora de l'estabilitat i activitat en diferents aplicacions.

També es fa una menció als processos i aplicacions més rellevants en el món industrial alimentari lacteri, conjuntament amb una descripció d'acord amb l'aplicació. S'hi tracten productes com la llet, els iogurts, els formatges o els gelats, relacionant-los amb un esquema del procediment d'elaboració, per observar esquemàticament com la lactasa té un paper important a la indústria.

Finalment, es presenten els aspectes relacionats amb la legislació, la qual és important conèixer per múltiples raons, com el compliment legal amb les normes i regulacions, protecció i seguretat, etc.

2. Agraïments

En aquestes primeres línies vull expressar el meu agraïment més sincer als qui han fet possible la realització d'aquest Treball de Fi de Grau.

Primerament, vull agrair a la meva tutora de TFG, Maria Elena Saguer Hom, per la seva orientació, suport i dedicació durant aquest procés. Els seus consells i coneixements han estat essencials per a l'elaboració d'aquest treball.

Als meus pares, Javi i Anna, per ensenyar-me que estudiar, lluny de ser una obligació, és un privilegi.

I no vull oblidar agrair a la Universitat de Girona per proporcionar-me una educació de qualitat i per crear un ambient propici per a l'aprenentatge. Els coneixements que he adquirit durant la meva formació en aquesta institució han estat fonamentals per a la realització d'aquest treball.

Finalment, vull expressar la meva gratitud a tots aquells que, d'una manera o una altra, han contribuït al meu creixement acadèmic i personal durant aquesta etapa de la meva vida.

3. Introducció

La digestió és un procés important i molt complex que es produeix en els organismes per obtenir energia i nutrients dels aliments consumits i implica molts factors diferents. La implicació del sistema gastrointestinal i el paper dels enzims és imprescindible per poder descompondre els aliments i assolir-ne els nutrients. La seva presència és essencial per a un correcte funcionament dels processos metabòlics que tenen lloc en el nostre organisme, perquè sense enzims no serien possibles molts processos necessaris per mantenir la vida.

El meu interès en els enzims ha estat una realitat des que vaig començar a estudiar el Grau en Innovació i Seguretat Alimentària. Un dels motius principals d'aquesta raó és la intolerància a la lactosa del meu pare. Des de que tinc ús de raó, a casa s'ha consumit llet sense lactosa i diversos productes lliures de lactosa. El treball de Fi de Grau ha estat una oportunitat clara per voler aprendre més i com aquesta afecta el nostre cos. Aquesta recerca m'ha ajudat a comprendre millor la seva condició i prendre decisions informades sobre la seva dieta i estil de vida. També aprendre alternatives als productes lactis que siguin segurs i adequats per al consum es un tema important per mi. M'agrada cuidar la meua alimentació i poder investigar sobre productes sense lactosa, i com aquests afecten a la dieta, és un motiu més pel qual vaig decidir escollir aquest tema.

En l'aplicació dels enzims a la indústria alimentària, són utilitzats per a diverses funcions, com ara millorar la textura i la consistència dels aliments, afavorir la fermentació o millorar la seva digestibilitat.

Dins dels carbohidrats, la lactosa és una molècula clau que presenta problemes de digestió per a moltes persones. La seva hidròlisi en monosacàrids és necessària per a la seva absorció eficient a l'intestí prim, i la seva deficiència pot causar problemes de salut com ara la intolerància a la lactosa. Per això, també es tractarà la lactasa, que es l'enzim encarregat de la hidròlisi d'aquest sucre, així com de les possibles solucions que existeixen per a aquelles persones intolerants a la lactosa ja sigui a través de la ingesta de l'enzim o de productes sense lactosa, i de la seva aplicació en diferents àmbits a l'indústria.

Tenint en compte les explicacions anteriors, els objectius principals d'aquest projecte s'emmarquen en una revisió bibliogràfica general que pretén analitzar el paper de la lactasa a la indústria i com aquesta afecta a aquells que no la poden digerir correctament.

1. Comprendre i analitzar com els **enzims** catalitzen reaccions químiques en sistemes biològics, amb especial atenció al cas de la lactasa i el seu paper en la degradació de la lactosa.
2. Estudiar les propietats de la **lactosa** i la seva aplicació a la indústria alimentària, incloses les propietats funcionals i fisicoquímiques i la seva rellevància per a la formulació i processament dels aliments, com també la seva obtenció a nivell industrial.
3. Estudiar quin és l'impacte de la **intolerància** a la lactosa a la població i com aquesta ha anat evolucionant amb el pas del temps.
4. Analitzar la tecnologia de **producció i ús de lactasa** utilitzada a la indústria alimentària, estudiar diferents fonts de lactasa, com la fermentació microbiana i la producció recombinant, per entendre el mètode de producció, avaluar la seva eficiència i viabilitat econòmica i explorar possibles millores o innovacions en aquest àmbit.
5. Com ha evolucionat el **mercat** de productes sense lactosa en els últims anys i com afecta això a la producció i a les **alternatives de consum** no alimentaries.

4. Material i mètodes

Per realitzar aquesta recerca bibliogràfica, es van utilitzar les bases de dades PubMed, Scielo, Scopus i Google Acadèmic, per la recopilació de literatura científica relacionada amb la lactasa i la seva aplicació a la indústria alimentària.

La cerca bibliogràfica va ser duta a terme seguint una sèrie de pautes que va donar lloc a la següent estructura:

- Cerca inicial: es va usar per descobrir quan i quant s'havia escrit sobre el tema, a més de per obtenir una idea global. També va permetre descartar altres temes que no hi guardaven tanta relació. Per això, en primer lloc, es va fer una cerca general per aconseguir informació dels aspectes més bàsics. Un cop fet això, es va aprofundir més sobre el tema fent cerques bibliogràfiques a diferents bases de dades com Scielo, PubMed i Scopus. Gràcies a la selecció d'aquests primers articles i a l'assessorament de la meva tutora, es va poder elaborar un índex amb diferents apartats sobre els quals s'havia de tractar al Treball de Fi de Grau.
- Cerca sistemàtica: un cop planificada l'estratègia de cerca, es van establir descriptors o paraules clau i el camp i el període de cerca. Gràcies a això, es van seleccionar articles de forma més ordenada, alhora que es van organitzar a carpetes en funció del tema tractat. Es van definir una sèrie de termes de cerca relacionats amb la lactasa i la seva aplicació a la indústria, com ara "lactasa", "indústria alimentària", "aplicació de lactasa", "producció de lactasa", "lactasa recombinant", etc. Aquests termes es van combinar amb altres termes per obtenir resultats més específics. Les estratègies de cerca es van aplicar a cada base de dades utilitzada, seguint les seves instruccions i utilitzant els camps de cerca adequats.
- Cerca interna: es va fer ús de les cites i la bibliografia dels articles trobats per realitzar una darrera cerca i selecció.

Els articles assolits a partir de les cerques es van sotmetre a una selecció basada en criteris predefinits, sobretot fent èmfasi en els articles de revisió. Es van excloure articles que no estaven disponibles en text complet, articles repetits, articles en idiomes que no es podien comprendre i articles que no estaven directament relacionats amb el tema d'investigació.

Es van examinar un total de 95 articles dels quals vaig escollir 57, i també es va fer ús del llibre "Principles of Biochemistry, 7th Edition" de Nelson i Cox com a font de referència per aprofundir en els fonaments de la bioquímica rellevants per al tema del treball, concretament el Capítol 6, que tracta sobre els enzims. Aquests recursos em van proporcionar la informació rellevant i imprescindible per complir amb els objectius d'aquest treball.

També per la recerca d'imatges he utilitzat Google Imágenes, i també imatges pròpies d'articles. Pel que fa a la cerca d'imatges al Google Imágenes, sempre he triat imatges de pàgines web oficials, ja sigui de medicina, nutrició, o d'articles científics trobats a partir de la imatge.

Pel que fa a l'elaboració del treball, es va fer ús de Microsoft Word, tant per planificar com redactar tota la informació en un sol document.

5. Introducció sobre enzims

5.1 Fonaments

Els enzims són proteïnes que catalitzen reaccions químiques específiques i de manera molt eficient en els éssers vius (tot i que també es coneixen algunes molècules d'ARN catalítiques, conegudes amb el nom de ribozimes) (Szilagyi, 2019). Això és especialment important per a les reaccions químiques que ocorren en el cos humà, ja que sovint són massa lentes per mantenir la vida si no estan catalitzades per enzims. Una reacció catalitzada per enzims comença quan l'enzim s'uneix al substrat (molècula que serà transformada per l'enzim) i, a continuació, ocorren una sèrie de reaccions químiques que condueixen a la transformació del substrat en un producte, les quals passen per la formació d'un complex enzim-substrat. Aquest concepte està representat en la Figura 1. Una vegada format el producte, l'enzim s'allibera del complex enzim-substrat i queda lliure per a unir-se a un altra molècula de substrat i començar el procés novament. La unió de l'enzim al substrat és altament específica. (Nelson i Cox, 2017).

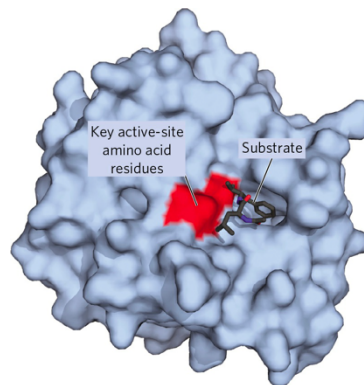


Figura 1: Unió d'un substrat a la chimotripsina. Alguns residus d'aminoàcids clau del lloc actiu apareixen com una taca vermella a la superfície de l'enzim. Font: Nelson i Cox (2017).

Els enzims tenen la capacitat de reduir l'energia d'activació requerida per a la reacció, el que significa que l'energia lliure de Gibbs necessària per a la reacció és més baixa (Figura 2), indicant que la reacció té una major probabilitat de succeir i que serà més fàcil d'aconseguir la seva formació de productes. L'energia lliure de Gibbs (ΔG) és una mesura de l'energia disponible d'un sistema per realitzar treball i, per tant, és una mesura de la seva espontaneïtat.

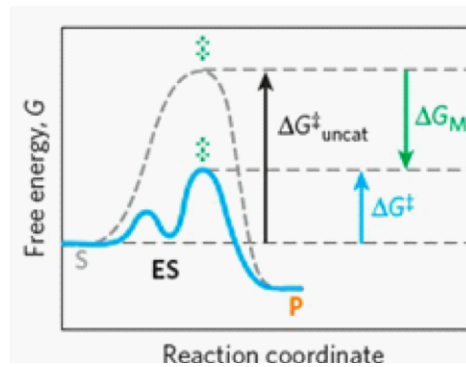


Figura 2: Efecte dels catalitzadors sobre l'energia lliure de Gibbs de les reaccions.
Font: Nelson i Cox (2017).

A la Figura 2, la línia de color blau clar mostra l'efecte de la presència d'un catalitzador sobre l'energia lliure de Gibbs d'una reacció. Això també significa que la reacció és més espontània, té més probabilitats de produir-se i de fer-ho més ràpidament. (Nelson i Cox, 2017).

5.2 Enzims i cinètica enzimàtica

5.2.1 Enzims

En tractar-se de proteïnes, l'activitat catalítica dels enzims depèn de la integritat de la seva conformació nativa. Quan un enzim es desnatura o es dissocia en les seves subunitats, generalment perd la seva activitat catalítica. (Szilagyi, 2019).

A nivell molecular un enzim està compost per una seqüència única d'aminoàcids que es plega en una estructura tridimensional complexa. La seqüència d'aminoàcids que compon un enzim és codificada per un gen de l'ADN d'un organisme. Les mutacions als gens que codifiquen els enzims poden canviar la seqüència d'aminoàcids i, per tant, l'estructura tridimensional de l'enzim, cosa que pot afectar la funció catalítica. A més, l'activitat enzimàtica està afectada per diversos factors, com la concentració de substrat, el pH i la temperatura, així com per la presència d'activadors i inhibidors (Szilagyi, 2019).

Els enzims tenen una estructura general que inclou diverses característiques clau. El lloc actiu d'un enzim és la regió on els substrats específics s'uneixen a l'enzim,

catalitzant la reacció química. El lloc d'unió al substrat juntament amb el lloc catalític formen el centre actiu de l'enzim. El substrat és més petit que l'enzim i queda perfectament encaixat dins del centre actiu per aconseguir la reacció desitjada (Nelson i Cox, 2017).

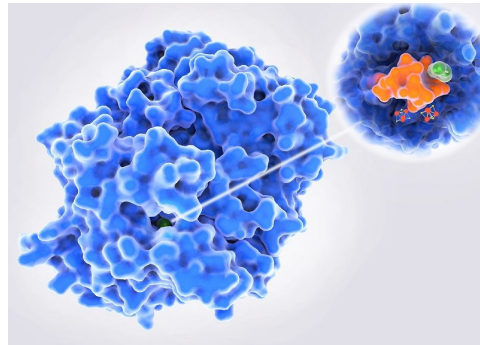


Figura 3: Deshidrogenasa bacteriana i detall del seu centre actiu. Font: McLaughlin (2020).

Alguns enzims no requereixen grups químics per funcionar, però d'altres requereixen un component químic addicional conegut com a cofactor, que pot ser un o més ions inorgànics com Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} , o una molècula orgànica o metal·lorgànica coneguda com a coenzim (Nelson i Cox, 2017). Un grup prostètic és un coenzim o un ió metàl·lic que s'uneix de forma forta o fins i tot covalent a la proteïna enzimàtica. Un holoenzim és un enzim completament funcional que és catalíticament actiu juntament amb el seu coenzim i/o ions metàl·lics units. El component proteic d'un holoenzim s'anomena apoenzim. Finalment, algunes proteïnes enzimàtiques pateixen modificacions covalents a través de diversos processos com la glicosilació i la fosforilació (Nelson i Cox, 2017). Tots aquests conceptes queden reflectits a la Figura 4.

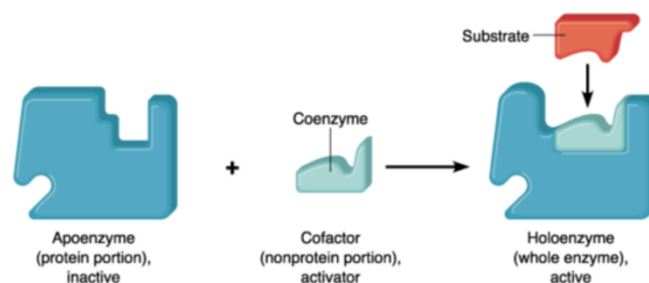


Figura 4: Estructura d'un holoenzim: apoenzim i cofactor Font: BiologyOnline (2022).

5.2.2 Classificació dels enzims

Els enzims es classifiquen segons les reaccions que catalitzen i sovint es nomenen afegint el sufix "-asa" al nom del seu substrat o a una paraula que descriu la seva activitat. Per exemple, la ureasa catalitza la hidròlisi de la urea i l'ADN polimerasa catalitza la polimerització de nucleòtids per formar ADN. Alguns enzims també van ser nomenats pels seus descobridors abans de conèixer la reacció específica que catalitzaven, com la pepsina, un enzim involucrat en la digestió que va ser nomenada en funció de la seva funció àmplia en la digestió (Nelson i Cox, 2017).

Taula 1: Classificació internacional d'enzims mitjançant l'ús del nom de la classe de l'enzim en relació amb el tipus de reacció catalitzada. Font: Nelson i Cox (2017).

Classificació internacional d'enzims		
Nº	Nom de la classe	Tipus de reacció catalitzada
1	Oxidoreductases	Transferència d'electrons (ions hidrur o àtoms d'H)
2	Transferases	Reaccions de transferència grupal
3	Hidrolases	Reaccions d'hidròlisi (transferència de grups funcionals a l'aigua)
4	Liasas	Escissió de C—C, C—O, C—N o altres enllaços per eliminació, deixant dobles enllaços o anells, o addició de grups a dobles enllaços
5	Isomerasas	Transferència de grups dins de molècules per produir formes isomèriques
6	Ligases	Formació d'enllaços C—C, C—S, C—O i C—N per reaccions de condensació acoblades a la ruptura d'ATP o cofactor similar

Les hidrolases són enzims que trenquen molècules més grans en molècules més petites per facilitar-ne la digestió o la utilització. Un exemple d'hidrolasa seria la lactasa, la qual catalitza la hidròlisi de la lactosa mitjançant l'addició d'aigua (Nelson i Cox, 2017). Hi ha dos tipus d'hidrolases: les exògenes, que actuen a l'exterior de la cèl·lula o la membrana cel·lular, i les endògenes, que actuen dins la cèl·lula. La

lactasa produïda per certes soques de bacteris i fongs que s'utilitza per hidrolitzar la lactosa, és exògena. D'aquesta manera, la lactasa industrial és segura per a persones amb intolerància a la lactosa, ja que no prové de la llet, sinó que es produeix mitjançant tècniques de fermentació a partir de microorganismes seleccionats (Szilágyi, 2019).

5.2.3 Inhibició enzimàtica

Els enzims també estan subjectes a l'acció d'agents inhibidors. Els inhibidors d'enzims són molècules que interfereixen amb la catàlisi, alentint o aturant les reaccions enzimàtiques, i tenen aplicació en el camp dels aliments i en farmacologia, entre d'altres. Concretament, l'aspirina és un exemple d'un inhibidor d'enzims que bloqueja l'activitat de l'enzim involucrat en la síntesi de prostaglandines, compostos implicats en la producció de dolor. L'estudi dels inhibidors enzimàtics ha proporcionat informació valuosa sobre els mecanismes enzimàtics i ha ajudat a comprendre millor les vies metabòliques. Els inhibidors enzimàtics es classifiquen en dues grans classes: reversibles i irreversibles; i l'ús i l'estudi són fonamentals en la investigació i el desenvolupament de medicaments (Nelson i Cox, 2017).

Taula 2: Tipus d'inhibidors enzimàtics i mecanismes d'actuació. Font: Nelson i Cox (2017).

INHIBIDORS REVERSIBLES	INHIBIDORS IRREVERSIBLES
<p><i>Competitius</i></p> <p>competeixen amb el substrat (S) pel centre actiu de l'enzim; s'assemblen al substrat</p>	<p>Es combinen amb/destrueixen un grup funcional necessari per a l'activitat enzimàtica. Es forma un enllaç covalent.</p> <p>Exemple: Inhibidors d'acetilcolinesterasa; interfereixen amb la transmissió de l'impuls nerviós</p>
<p><i>No competitius</i></p> <p>no competeixen amb el S; l'inhibidor té un punt d'unió diferent i poden unir-se tant a l'enzim lliure (E) com al complex ES</p>	
<p><i>Acompetitius</i></p> <p>s'uneixen directament al complex ES i no a E</p>	

En l'àmbit alimentari i nutricional, és important comprendre els efectes que certs components dels aliments poden tenir en la digestió i l'absorció de nutrients, com ara els inhibidors enzimàtics. Entre aquests últims s'hi troben els inhibidors de proteases, enzims clau en la regulació de processos cel·lulars, la presència dels quals en alguns aliments pot comportar una pèrdua nutricional. Entre ells, s'hi troben inhibidors que interfereixen amb l'acció dels enzims proteolítics del tracte digestiu, especialment amb la tripsina pancreàtica i la quimotripsina (Sandarani i Kulathunga, 2019).

Aquests inhibidors són presents en una àmplia varietat d'aliments d'origen vegetal, com ara cigrons, soja i altres tipus de llegums. Un altre exemple d'inhibidors enzimàtics són els que s'uneixen a α -amilases fent-les inactives. S'utilitzen en diverses aplicacions a la indústria alimentària, com per exemple per predir l'estabilitat de l'escuma de cervesa (Popova i Mihailova, 2019).

Per exemple, els resultats d'una electroforesi bidimensional (2DE) de les proteïnes de la cervesa van indicar una clara relació entre l'inhibidor d'amilasa dimèrica d'ordi-1 (BDAl-1) i l'estabilitat de l'escuma de la cervesa (Takashi *et al.*, 2008). Amb la tècnica 2DE, les proteïnes de la cervesa se separen primer segons la seva càrrega elèctrica i després segons la seva grandària molecular, generant bandes de proteïnes que s'analitzen i comparen entre diferents mostres de cervesa per determinar si hi ha alguna relació entre les intensitats de bandes de proteïnes i estabilitat de l'escuma de la cervesa. Durant el desenvolupament d'un nou mètode de predicció de l'estabilitat de l'escuma de la cervesa, es va aplicar l'anàlisi de regressió lineal múltiple dels resultats obtinguts en les intensitats de les taques obtingudes de les proteïnes de la cervesa en els gels 2DE. Es van quantificar i utilitzar com a variables explicatives. Les estabilitats de l'escuma de 25 mostres de cervesa elaborades a partir de malta amb diferents modificacions de malta d'un dels tres cultius (cultius A, B i C) es van realitzar per explicar les intensitats de les taques de BDAl-1 amb un nivell de significació del 5% ($r = 0,421$). A més, es van observar dues altres taques de proteïnes importants (b0 i b5) en els gels 2DE de mostres de cervesa comercial japonesa amb diferent estabilitat d'escuma. A continuació, es va calcular la regressió múltiple per a l'estabilitat de l'escuma utilitzant aquestes tres intensitats de taques com a variables explicatives. Com a resultat, el 72,1% de l'estabilitat de l'escuma de les 25 mostres

de cervesa es va explicar gràcies a una nova equació de regressió múltiple calculada utilitzant la taca b0 i BDAI-1 com a variables explicatives positives i la taca b5 com a variable negativa. Per verificar la validesa de l'equació de regressió múltiple i les variables explicatives, es van agafar altres mostres de cervesa diferent per analitzar l'estabilitat de l'escuma. Com a resultat, el 81,5% de l'estabilitat de l'escuma de les 10 mostres de cervesa comercial japonesa utilitzant la taca b0 i BDAI-1 com a variables explicatives positives i la taca b5 com a variable negativa. En conclusió, la taca b0 i BDAI-1 es van considerar variables positives, mentre que la taca b5 va ser una variable negativa. Fent un anàlisi de l'espectrometria de masses, juntament amb les cerques a bases de dades, van confirmar que les taques de proteïnes b0 i b5 eren la proteïna Z originada de l'ordi i la tioredoxina originada del llevat, respectivament. Això confirma que BDAI-1 i la proteïna Z són factors que afecten l'estabilitat de l'escuma. (Takashi et al., 2008).

En general, una concentració més gran de proteïnes en l'escuma de la cervesa pot contribuir a una major estabilitat i durada de l'escuma. Les proteïnes actuen com a agents tensioactius, reduint la tensió superficial de la cervesa i ajudant a formar i estabilitzar les bombolles de gas a l'escuma (Popova i Mihailova, 2019).

A més, la inhibició de l' α -amilasa és una estratègia per al tractament de trastorns en l'absorció de carbohidrats, com la diabetis tipus 2, en reduir els nivells d'insulina al cos i millorar la resposta glucèmica (Sandarani i Kulathunga, 2019).

5.2.4 Cinètica enzimàtica

La cinètica enzimàtica representa gràficament la relació entre la concentració de substrat que s'afegeix a una reacció enzimàtica i la velocitat de reacció resultant, per a una concentració determinada d'enzim i mantenint també constants tots els altres factors que poden afectar la taxa de la reacció (pH, temperatura,...). El seu comportament s'ajusta a una corba de saturació. En el cas dels enzims, a mesura que augmenta la concentració de substrat, la velocitat de reacció també augmenta, però només fins a cert punt, ajustant-se a un comportament sigmoïdal descrit per la cinètica

de Michaelis-Menten (Figura 5). Quan tots els centres actius de l'enzim estan ocupats pel substrat, la velocitat de reacció s'estabilitza i tendeix asimptòticament a un valor màxim. Aquest punt es coneix com a velocitat màxima o V_{\max} (Nelson i Cox, 2017).

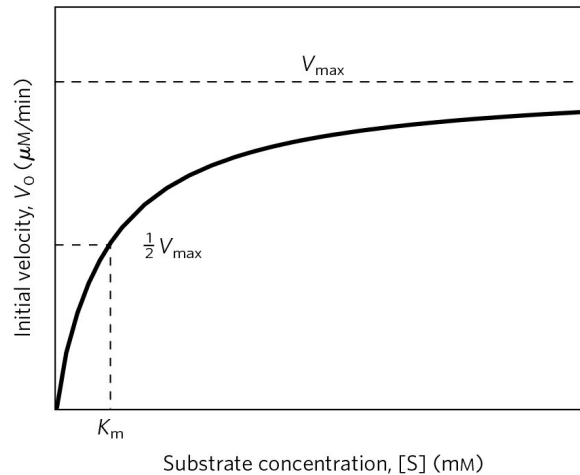


Figura 5: Cinètica de Michaelis-Menten: relació entre la concentració de substrat i la velocitat de la reacció enzimàtica per a una concentració determinada d'enzim. A la figura es mostren els paràmetres cinètics de la reacció (velocitat màxima o V_{\max} , i constant de Michaelis-Menten o K_m). Font: Nelson i Cox (2017).

La cinètica enzimàtica es pot descriure mitjançant l'equació de Michaelis-Menten (Equació 1), on s'estableix que la velocitat de la reacció és proporcional a la concentració del substrat en condicions de saturació de l'enzim (Nelson i Cox, 2017).

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equació 1})$$

on V_0 és la velocitat inicial de la reacció, la qual es determina a partir de la corba que representa la concentració de producte format al llarg del temps per a cada concentració de substrat assajada i calculat com el pendent de la zona lineal de la corba (Figura 6); V_{\max} , la velocitat màxima de la reacció; $[S]$, la concentració de substrat; i K_m , la constant de Michaelis-Menten (Nelson i Cox, 2017).

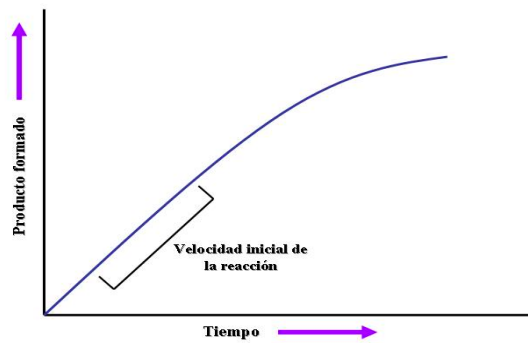


Figura 6: Gràfica de la saturació d'un enzim. Font: García (2008).

La constant de Michaelis-Menten (K_m) representa la concentració de substrat a la qual la velocitat és la meitat de la velocitat màxima, i indica l'afinitat de l'enzim pel substrat. És a dir, quant més baix és el valor de K_m , més gran és l'afinitat de l'enzim pel substrat (Nelson i Cox, 2017).

A partir del gràfic corresponent a la cinètica de Michaelis-Menten no és possible determinar de manera precisa els paràmetres cinètics (V_{max} i K_m). Per a això, es fa ús del diagrama de Lineweaver-Burk (Figura 7). Aquesta representació és una transformació de l'equació de Michaelis-Menten, utilitzant els recíprocs tant de la concentració de substrats com de la velocitat inicial de la reacció. La representació de Lineweaver-Burk genera una línia recta amb un pendent igual a K_m/V_{max} i que intercepta l'eix de les y en el punt que correspon a l'invers de V_{max} ($1/V_{max}$). La representació de Lineweaver-Burk també permet comparar la cinètica de diferents enzims o condicions experimentals en un sol gràfic, cosa que facilita la interpretació i la comparació de les dades cinètiques (Nelson i Cox, 2017).

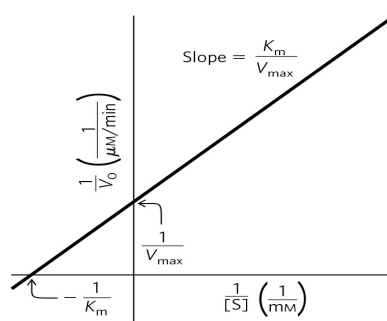


Figura 7: Diagrama de Lineweaver-Burk. Font: Nelson i Cox (2017).

5.2.5 Efecte de les condicions del medi sobre l'activitat enzimàtica

En sistemes vius, la catàlisi enzimàtica de reaccions és essencial. Sota condicions biològicament rellevants, les reaccions sense catalitzar tendeixen a ser lentes, ja que la majoria de les molècules biològiques són força estables a l'entorn aquós, de pH neutre i temperatura moderada dins de les cèl·lules. A més, molts processos químics comuns són desfavorables o improbables en l'ambient cel·lular, com la formació transitòria d'intermediaris carregats inestables o la col·lisió de dues o més molècules en l'orientació precisa requerida per a la reacció. Les reaccions necessàries per a la digestió d'aliments, la transmissió de senyals nerviosos o la contracció muscular, simplement no passen a una velocitat útil sense la presència de catalitzadors (Nelson i Cox, 2017).

La corba de saturació és una eina important per entendre la cinètica enzimàtica i per determinar l'eficàcia d'un enzim en particular en la transformació de substrats. Permet estudiar com les condicions experimentals (pH, temperatura...) afecten l'activitat de l'enzim. Els enzims són proteïnes que es pleguen adoptant una forma tridimensional específica per funcionar correctament, i qualsevol canvi en les condicions ambientals pot alterar aquesta estructura. Per tant, les estructures primària, secundària, terciària i quaternària (si és el cas) dels enzims juguen un paper determinant de cares a la seva funcionalitat (Nelson i Cox, 2017).

La temperatura afecta l'activitat enzimàtica. Els enzims són proteïnes i, com a tals, estan sotmeses a les lleis de la termodinàmica. En general, l'activitat dels enzims augmenta amb la temperatura fins que s'assoleix una temperatura òptima, a partir de la qual disminueix a causa de la desnaturalització de l'enzim i que varia depenent de cada enzim. La desnaturalització és el procés pel qual les proteïnes, incloent-hi els enzims, perden la seva estructura tridimensional nativa, la qual és crítica per al seu correcte funcionament. A mesura que la temperatura augmenta, les vibracions de les molècules també augmenten, incrementant la cinètica molecular i fent que les interaccions entre les molècules de proteïna es tornin menys estables. Això pot provocar que les estructures tridimensionals es desestabilitzin, desencadenant la desnaturalització. Per contra, a temperatures baixes, els enzims es tornen menys

actius, ja que la disminució de l'energia tèrmica redueix la mobilitat de les molècules, incloent-hi l'enzim i el substrat. Això pot resultar en una disminució de la taxa de reacció enzimàtica, ja que les col·lisions entre l'enzim i el substrat són menys freqüents. (Szilagy, 2019).

L'activitat de l'enzim també pot variar amb el pH, amb una activitat òptima en un rang específic de pH, mentre que per sobre o per sota d'aquest rang la seva activitat disminueix (Nelson i Cox, 2017). El pH afecta la càrrega elèctrica dels aminoàcids que formen part de l'enzim, provocant alteracions en la seva estructura i, per tant, en la seva activitat catalítica. A la Figura 8 es mostra el pH òptim i el rang de pH on són actius dos enzims diferents; concretament, la pepsina -una peptidasa que es troba a l'estómac- i la glucosa-6-fosfatasa dels hepatòcits (cèl·lules del fetge) - responsable d'alliberar glucosa a la sang -.

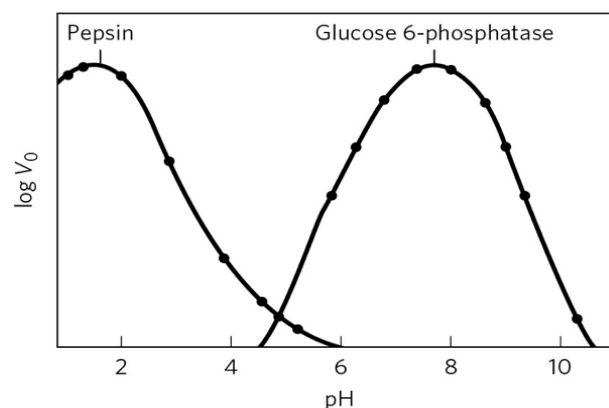


Figura 8: Perfils d'activitat en funció del pH de dos enzims diferents: peptidasa i glucosa-6-fosfatasa. Font: Nelson i Cox (2017).

En la Figura 8, tant el pH com els canvis en V_0 es representen en una escala logarítmica. En general, el pH òptim per a l'activitat enzimàtica és a prop del pH de de l'entorn en el que es troba l'enzim de forma natural. Per exemple, la pepsina té un pH òptim d'aproximadament d'1.6, que coincideix amb el pH del suc gàstric que es troba entre 1 i 2, mentre que la glucosa 6-fosfatasa dels hepatòcits té un pH òptim del voltant de 7.8 (Nelson i Cox, 2017).

6. La lactosa

La lactosa és un disacàrid compost per glucosa i galactosa, representat a la Figura 9. Reconegut mundialment com el "sucre de la llet", només es troba a la llet i la seva única font natural coneguda són les glàndules mamàries dels mamífers (Walker i Thomas, 2019). La seva hidròlisi es produeix per l'acció de l'enzim lactasa a l'intestí prim.

La presència de lactosa a la llet ha evolucionat durant milers d'anys, convertint-se en un factor crucial en la capacitat de consum de llet per part dels éssers humans adults en l'últim mil·lenni.

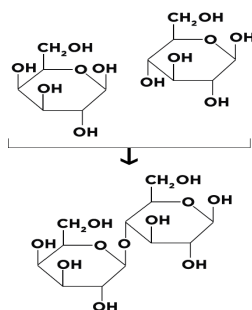


Figura 9: Molècula de β -D-lactosa i les dues molècules que la componen. Font: Romero *et al.* (2019).

La lactosa existeix en dues formes isomèriques conegudes com α -lactosa i β -lactosa, les quals difereixen en la configuració estèrica del grup substituent C1 (OH i H) de la fracció de glucosa. Les dues formes anomèriques es poden diferenciar fent ús de la seva rotació específica, és a dir, fent servir la polarimetria (Dominici *et al.*, 2022). Cada forma té una rotació específica diferent, ja que la posició del grup hidroxil en el carboni anomèric influeix en la manera en què la llum polaritzada passa a través de la molècula. (Szilagyi, 2019).

La lactosa representa la principal font de substrat energètic per als lactants i nadons, presentant-se en proporcions variables segons l'espècie animal de la qual es recull la llet. Aquells individus amb una capacitat reduïda per a digerir la lactosa es troben en un estat de deficiència de lactasa, enzim responsable de la seva hidròlisi.

6.1 Procés bioquímic de la síntesi de la lactosa a la glàndula mamària

La síntesi de lactosa a la glàndula mamària dels mamífers requereix la combinació d'una molècula de glucosa i una altra de galactosa. La glucosa és subministrada pel torrent sanguini arterial, mentre que la galactosa és sintetitzada a la glàndula mamària a partir de la glucosa absorbida. El procés de síntesi de lactosa implica l'activació de la glucosa i la conversió d'aquesta en uridina difosfat galactosa (UDP-galactosa) que posteriorment es combina amb la glucosa per formar lactosa amb l'ajuda de la lactosa sintasa. L'última etapa de síntesi passa a l'aparell de Golgi present a les cèl·lules epitelials de la glàndula mamària. Després de la síntesi, la lactosa es transporta en vesícules citoplasmàtiques cap a la llum intestinal, on se secreta (Walker i Thomas, 2019).

Una propietat important a destacar en el procés bioquímic de la síntesi de lactosa a la glàndula mamària és que la lactosa no pot difondre fora de l'aparell de Golgi o de les vesícules secretores, cosa que en facilita la secreció i ajuda a extreure aigua cap a aquests orgànuls, i alhora determina el volum de llet produït (Walker i Thomas, 2019).

6.2 Absorció i destinació dels productes de la digestió de la lactosa

La lactosa, per poder ser absorbida de manera eficient a l'intestí prim, s'ha de descompondre en els monosacàrids que la constitueixen. Aquesta hidròlisi està controlada per la lactasa (LCT, també coneguda com β -galactosidasa o lactasa florizina hidrolasa (LPH)), un enzim homodimèric ancorat a les membranes de les puntes de les vellositats de l'intestí prim; concretament és a la part mitjana de l'intestí prim o jejú on es troba en la seva màxima expressió (Romero et al., 2019).

La major part de la lactosa ingerida s'absorbeix en forma dels seus productes monosacàrids (D-glucosa i galactosa), resultants de la digestió. Els sucres s'absorbeixen des de la llum intestinal superior (duodè i jejú) cap al torrent sanguini. Tant la glucosa com la galactosa són absorbides pels enteròcits mitjançant un procés de cotransport amb sodi, intervingut per un transportador dependent d'energia que

utilitzat transport actiu. Posteriorment, són alliberades a la circulació a través d'una proteïna de transport de difusió facilitada, que és la mateixa per als dos monosacàrids (Szilagyi, 2019).

Mentre que la glucosa entra directament a la glucòlisi i s'utilitza en gran mesura per a l'obtenció d'energia (i algunes funcions estructurals), la galactosa requereix una via metabòlica universal única per al seu catabolisme i desintoxicació potencial, però té múltiples funcions de comunicació estructurals i cel·lulars (Szilagyi, 2019).

Tot i això, en un estudi es van trobar petites quantitats de lactosa en sang intacta després de la ingestió de llet i la seva quantitat estava inversament relacionada amb la galactosa (Pimentel et al., 2017; Szilagyi, 2019). Això suggereix que, en aquest cas, la digestió de la lactosa a l'intestí prim no va ser completa i una part de la lactosa no es va descompondre. Això podria ser degut a una deficiència de lactasa, l'enzim que descompon la lactosa, o altres factors que afecten la digestió de la lactosa a l'intestí prim.

En el cas de que hi hagi deficiència de lactasa en l'organisme, el disacàrid no es digereix adequadament (maldigestió de lactosa) i, per tant, no es pot absorbir (malabsorció de lactosa) i és fermentat per la microbiota intestinal, cosa que pot causar símptomes gastrointestinals desagradables com flatulència, distensió abdominal, diarrea i dolor abdominal (representat a la Figura 10).

Aquests símptomes són causats per la producció excessiva d'àcids grassos de cadena curta i gasos per part dels bacteris que fermenten la lactosa no absorbida al còlon. A més, la fermentació de la lactosa també pot provocar una disminució del pH del còlon, cosa que pot afectar negativament l'absorció d'altres nutrients i minerals a l'intestí gruixut (Romero et al., 2019).

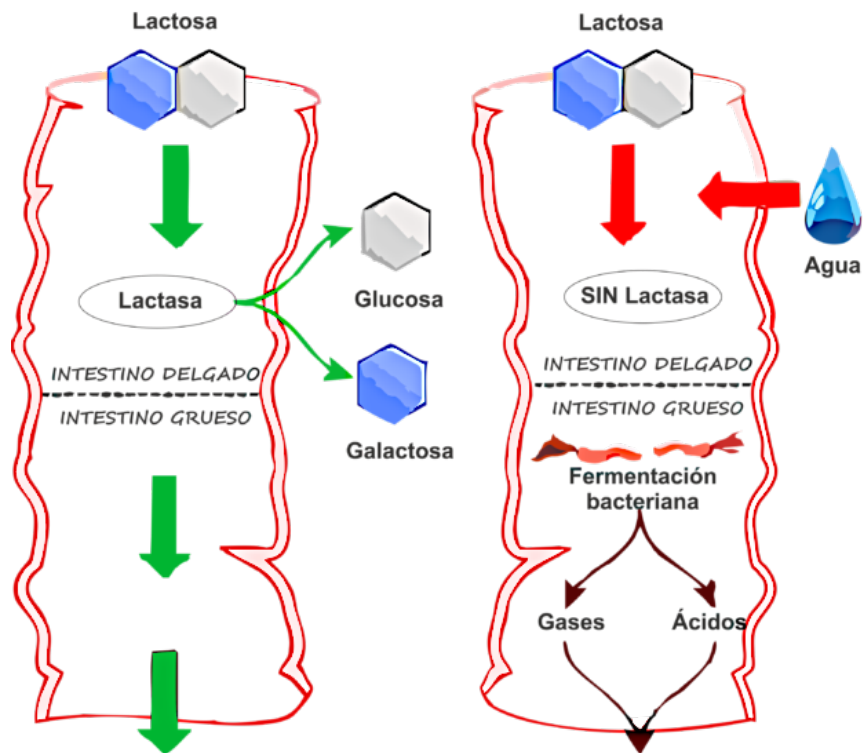


Figura 10: Esquema d'absorció de lactosa a l'intestí prim. A la banda esquerra, una bona absorció i, al costat dret, una mala absorció. Font: BIOLAN HEALTH (2021).

6.3 Fisiopatologia de la lactosa

La fisiopatologia de la lactosa fa referència a l'estudi de les alteracions fisiològiques i patològiques que ocorren en el cos humà en relació amb la digestió i l'absorció de la lactosa (Fassio et al., 2018).

Durant la gestació humana, es comença a detectar activitat de la lactasa a la superfície de la mucosa de l'intestí prim a partir de la setmana vuit. Aquesta activitat augmenta gradualment fins a la setmana trenta-quatre, assolint el seu punt màxim en néixer. Tot i això, dins dels primers mesos de vida, l'activitat de la lactasa comença a disminuir i, en la majoria dels mamífers, es redueix a nivells indetectables després del deslletament a causa de la regulació negativa de l'activitat de la lactasa durant la maduració (Fassio et al., 2018).

Hi ha certa controvèrsia pel que fa a la maduració de la lactasa intestinal en nounats. Alguns autors suggereixen que dins dels cinc dies posteriors al naixement, l'enzim

està completament disponible. Altres troben que en alguns nounats, la lactosa s'aboca a l'intestí gruixut, contribuint als canvis de la microbiota del còlon que ajuden en la nutrició neonatal (Fassio et al., 2018).

En humans, aproximadament el 30% de la població presenta persistència de lactasa, cosa que significa que continuen tenint activitat de lactasa després del deslletament i fins a l'edat adulta. Aquest fenomen passa principalment en persones d'ascendència del nord d'Europa i es relaciona geogràficament amb la introducció de la producció lletera (Lomer et al., 2007). Tanmateix, la fisiopatologia de la lactosa no només està relacionada amb factors genètics sinó que també pot estar influenciada per altres factors com l'edat, la dieta i la microbiota intestinal (Szilagyi i Ishayek, 2018). La incapacitat de digerir adequadament la lactosa a causa de la manca de lactasa és una condició fisiopatològica comunament coneguda com a intolerància a la lactosa o hipolactàsia que pateix aproximadament el 65% de la població (Szilagyi i Ishayek, 2018).

Dins de la fisiopatologia de la lactosa s'hi troben diferents graus d'hipolactàsia: la hipolactàsia congènita, determinada per una alteració autosòmic-recessiva de la regió reguladora del gen de la lactasa, és un trastorn rar amb pocs casos documentats; la hipolactàsia primària, que és el tipus més freqüent d'hipolactàsia, apareix al cap de pocs anys del naixement i es relaciona amb l'aparició de determinats polimorfismes a la regió reguladora del gen de la lactasa, que semblen associar-se a la persistència de la lactasa; i la hipolactàsia secundària, causada per una infecció intestinal aguda, bacteriana o vírica amb lesió transitòria de les vellositats intestinals, la presa de fàrmacs que alteren la permeabilitat mucosa intestinal (com per exemple, antibiòtics) i altres circumstàncies, com malnutrició o malaltia de Crohn (Gómez-Rodríguez, 2019).

Més recentment, s'ha descobert que altres nutrients relacionats amb els productes lactis, com els greixos i les caseïnes, també poden contribuir als símptomes digestius provocats per la intolerància a la lactosa. Les persones que experimenten símptomes d'intolerància a la lactosa després de consumir productes lactis han d'evitar no només els productes que contenen lactosa, sinó també aquells que contenen proteïnes de caseïna i greixos lactis per evitar complicacions i millorar la qualitat de vida (Szilagyi i

Ishayek, 2018). La caseïna i els greixos lactis són components importants dels productes lactis i és per això que quan es consumeixen poden desencadenar una resposta immunològica en algunes persones amb intolerància a la lactosa, cosa que pot agreujar els símptomes gastrointestinals. A més, els greixos lactis poden endarrerir el buidatge gàstric i la digestió (Szilagyi i Ishayek, 2018).

6.4 La lactosa a la indústria alimentària

La lactosa s'obté a nivell industrial principalment a partir de la llet de mamífers, especialment de la llet de vaca, i del sèrum d'aquesta. Es comença amb l'extracció, sotmeten la llet a diversos processos de filtració i centrifugació per separar la lactosa d'altres components, com ara el greix i les proteïnes. Llavors, aquesta es concentra evaporant la llet per augmentar la concentració de lactosa. Llavors, amb la cristal·lització, es deixa refredar i es deixa reposar perquè la lactosa es cristal·litzi i els cristalls de lactosa es separen mitjançant processos de filtració o centrifugació. I per últim l'assecat, per eliminar la humitat i obtenir lactosa en forma de pols. (Romero *et al.*, 2019).

És important destacar que la lactosa també es pot obtenir a partir d'altres fonts, com el sèrum de formatge, mitjançant processos similars d'extracció, concentració, cristal·lització i assecat. Tot i això, la llet de vaca és la principal font de lactosa utilitzada a nivell industrial.

A la indústria alimentària, la lactosa s'utilitza principalment com a ingredient tecnofuncional a causa de les seves propietats fisicoquímiques úniques. Un ingredient tecnofuncional és un component d'un aliment que aporta propietats no nutricionals que afecten el comportament de l'aliment durant el seu processat, emmagatzematge, i/o preparació en el moment del consum. Per exemple, poden actuar com a milloradors de textura i aportar sabor. Aquests ingredients poden ser naturals o sintètics i es fan servir per millorar la qualitat (incloent la sensorial) i la seguretat i la funcionalitat dels aliments, referint-se a la capacitat d'aquests en tenir propietats no nutricionals. Els rols més rellevants de la lactosa a la indústria són com a edulcorant, agent d'enfosquiment no enzimàtic, agent encapsulant, agent anticongelant, extensor de la vida útil i substrat de fermentació. Per altra banda, també té propietats que poden

ser indesitjables quan s'incorpora en la formulació per a l'elaboració del producte final o l'aliment en qüestió, com podria ser la seva baixa solubilitat, l'enganxositat (degut a la seva capacitat per absorbir i retenir l'aigua) i l'enduriment (Dominici et al., 2022).

A la Taula 3 es descriuen les principals propietats **positives i negatives** de la lactosa per a la producció d'aliments a la indústria (Dominici et al., 2022). Val a dir, però, que la lactosa existeix en dues formes cristal·lines: α i β lactosa. La diferència entre l' α -lactosa i la β -lactosa és important perquè pot afectar les propietats físiques i químiques de la lactosa. Per exemple, la β -lactosa és menys soluble en aigua que l' α -lactosa i cristal·litza més fàcilment. A més, la β -lactosa pot ser menys dolça que l' α -lactosa (Szilagyi, 2019). A la indústria alimentària, la lactosa s'utilitza per millorar la qualitat del sabor i la coloració dels aliments mentre que a la indústria farmacèutica, representa un excipient en medicaments orals i en inhalants (Dominici et al., 2022).

Taula 3: Propietats positives i negatives de la lactosa, aplicacions a la indústria alimentària. Font: modificat de Dominici et al. (2022).

PROPIETAT POSITIVA O NEGATIVA	CARACTERÍSTIQUES
Edulcorant	Dolçor: es mesura en comparació amb la sacarosa, que és el sucre de referència. La lactosa és menys dolça que la sacarosa, però encara té un paper important com a edulcorant en la producció de productes de confiteria i forneria
Agent d'enfosquiment no enzimàtic	La reacció de Maillard és una interacció entre aminoàcids i sucres reductors que produeixen sabors i colors desitjables en aliments. La lactosa, com a sucre reductor, contribueix a aquesta reacció. S'utilitza en productes enforats per obtenir una crosta daurada. Pel que fa a la caramel·lització, si s'exposa la lactosa a altes temperatures es descompon en compostos responsables del sabor i del color marró fosc característic dels aliments caramel·litzats, tot i que es poc propensa a patir caramel·lització degut a la seva elevada temperatura de caramel·lització
Agent encapsulant	La lactosa té una alta temperatura de transició vítria, el que la fa útil com a agent d'encapsulació en el procés d'assecatge per atomització (<i>spray-drying</i>). Això la fa apropiada per a la deshidratació d'aliments i medicaments, ajudant a mantenir separades les partícules recobertes i a millorar la seva dispersió, especialment en productes en forma de pols, gràcies a les propietats d'estabilitat i resistència a la calor durant el procés d'assecatge per atomització.

Agent anticongelant	La lactosa actua com a crioprotector en la fabricació de gelats, afectant la seva textura i consistència final. La quantitat de lactosa en la barreja de gelat afecta la temperatura de congelació i, per tant, la duresa del producte final. No obstant això, si s'utilitza una quantitat excessiva de lactosa, pot produir-se una sobresaturació i cristal·lització, afectant la textura i la vida útil del producte
Extensor de la vida útil	La lactosa s'afegeix a la preparació de productes enforats per absorbir compostos volàtils i colorants, cosa que ajuda a perllongar la vida útil. A més, influeix en la consistència, la viscositat i textura del producte, i també en la suavitat i alhora disminueix l'activitat d'aigua, de manera que estén la seva vida útil.
Substrat de fermentació	La lactosa s'utilitza com a substrat per a la fermentació en productes lactis com el iogurt i el quefir, i com a additiu en carns curades. En els productes lactis, els microorganismes iniciadors descomponen la lactosa en sucres simples i produeixen àcid làctic, reduint la capacitat de retenció d'aigua de les proteïnes, accelerant l'assecatge i disminuint el temps de processament
Solubilitat	La lactosa té una baixa solubilitat i pot cristal·litzar, el que provoca una textura sorrenca en els productes finals.
Enganxositat i enduriment	La lactosa pot patir enduriment durant l'emmagatzematge en forma de pols, especialment en condicions d'humitat relativament elevada o altes temperatures. Això és degut a la presència de monosacàrids (glucosa, galactosa) presents en la lactosa amorfa i la llet en pols. També es pot produir plastificació de la lactosa si absorbeix aigua, la qual cosa pot afectar la seva viscositat i enganxositat en aplicacions de recobriments. La temperatura de transició vítria de la lactosa amorfa anhidra és de 101-115 °C i la dels sòlids de la llet descremada és de 92 °C. Aquesta temperatura de transició vítria té relació amb l'enganxositat; si la temperatura ambient és superior a la temperatura de transició vítria de la lactosa amorfa, la lactosa es tornarà enganxosa i pot formar grumolls o aglomerats, el que coneix com a <i>caking</i> . Els problemes d'enganxositat causen un impacte econòmic considerable i limiten l'aplicació de les tècniques d'assecat per a alguns aliments (Robaina <i>et al.</i> , 2019)
Agent d'enfosquiment no enzimàtic	La lactosa pot experimentar enfosquiment no enzimàtic durant l'emmagatzematge, la qual cosa pot afectar la qualitat dels aliments. Això pot causar un canvi de color excessiu en productes com la llet en pols i el sèrum en pols. Així, la capacitat de la lactosa de patir enfosquiment no enzimàtic és un aspecte important a considerar en la seva utilització com a additiu o ingredient en aliments

6.5 Obtenció de lactosa per a aplicacions dins la indústria alimentària

La lactosa pot ser obtinguda industrialment mitjançant un procés d'aïllament i purificació a partir del sèrum de la llet, el qual és un subproducte comú de les indústries làcties. Aquest procés implica la ultrafiltració del sèrum per eliminar les proteïnes i aconseguir un permeat que conté la lactosa i altres components de la llet. Durant aquest procés, s'aplica pressió a la llet perquè pugui travessar una membrana semipermeable que reté les molècules més grans, com les proteïnes i el greix, mentre permet el pas de molècules més petites, com la lactosa i els minerals. La concentració del permeat s'aconsegueix mitjançant evaporació o, en alguns casos, mitjançant osmosi inversa (Dominici et al., 2022).

El permeat és ric en lactosa i altres carbohidrats i és àmpliament utilitzat com a ingredient a la indústria alimentària, particularment en la fabricació d'aliments per a nadons, productes de fleca i confiteria, així com en begudes esportives i de recuperació. També es fa servir en la producció de suplementos nutricionals i productes farmacèutics. Encara que sigui fàcil de produir, el permeat de lactosa presenta una limitació important, a causa del seu elevat grau d'higroscopicitat (capacitat de retenir la humitat), que en dificulta considerablement el maneig a fàbrica (Dominici et al., 2022).

A la indústria alimentària, es pot trobar una àmplia varietat d'aliments que contenen lactosa en la seva formulació, sigui de forma natural o afegida intencionadament amb fins específics. La llet i productes lactis, com el formatge, la mantega, la nata, el iogurt, el gelat, la llet condensada, la llet evaporada... són productes on la lactosa es troba naturalment present. En begudes làcties i batuts de proteïnes que continguin proteïna de sèrum de llet aquest sucre també hi és present, així com també en aliments fornejats, com pa, galetes, pastissos i pastisseria si contenen llet o sèrum de llet a la recepta. Alguns productes carnis també contenen lactosa en la seva composició, ja que la seva formulació inclou llet en pols, com seria el cas d'algunes salsitxes i hamburgueses. Altres tipus de productes que poden contenir lactosa: sopes i salses elaborades amb llet, nata o formatge ratllat; alguns cereals i barres de granola, que continguin llet en pols o proteïna de sèrum de llet; xocolata amb llet; i alguns dolços, com ara caramels de llet i xocolates farcides de crema (Dominici et al., 2022). També

cal destacar que existeixen suplementos nutricionals i multivitamínics que contenen lactosa com a excipient o ingredient afegit (Dominici et al., 2022).

6.6 Alternatives a l'ús de lactosa en la formulació d'aliments

A la Taula 4 es presenten alternatives per substituir les matèries primeres que contenen lactosa de manera natural. Aquesta oferta creixent d'aliments sense lactosa és fruit de l'augment de la consciència sobre la intolerància a la lactosa i la demanda del mercat per a opcions alimentàries alternatives.

Gràcies als avenços en l'estudi i la recerca del sector alimentari, actualment és possible obtenir una nutrició completa i equilibrada sense consumir productes lactis, sempre que se substitueixin per aliments alternatius igualment nutritius. Els productes lactis són una font important de calci, vitamina D i proteïnes; per tant, si s'eliminen de la dieta, és crucial assolir aquests nutrients d'altres fonts (Dominici et al., 2022).

Taula 4: Ingredients que contenen lactosa naturalment i les seves productes substitutius en la dieta. Font: Dominici et al. (2022).

MATÈRIES PRIMERES QUE CONTENEN LACTOSA NATURALMENT	POSSIBLE ALTERNATIVA A LA DIETA
Llet	Llet sense lactosa Begudes vegetals (de soja, arròs, espelta, ametlla, coco, civada, etc.) logurt sense lactosa
Mantega	Mantega sense lactosa Mantega d'oli Ghee Mantega vegetal (cacau, karité) Oli vegetal (oliva, gira-sol, càrtam...) Margarina 100% vegetal
Llet deshidratada	Llet deshidratada sense lactosa Llet vegetal
Formatge	Formatges naturalment sense lactosa ¹ Formatges "delactosats" ² Alternatives basades en plantes

¹ productes obtinguts de la transformació de la llet, en els quals la lactosa es redueix de manera natural gràcies al seu típic procés de fabricació

² han patit un tractament enzimàtic per descompensar la lactosa que assegura un producte final sense lactosa

En la infància, només es justifica la substitució temporal de la lactosa per altres carbohidrats en casos de símptomes greus d'intolerància. Així i tot, aquells individus amb disminució (epi)genètica o absència d'expressió de lactasa encara poden consumir una certa quantitat de lactosa, ja que presenta efectes beneficiosos en la regulació de la microbiota intestinal. (Szilágyi, 2019).

És rellevant destacar que evitar totalment els productes lactis no és una opció, perquè pot implicar una ingesta menor de nutrients importants com el calci i la vitamina B12 que es troben en aquests aliments, així com una ingesta de carbohidrats reduïda (Romero et al., 2019). És a dir, una persona intolerant a la lactosa no necessàriament ha de restringir totalment els productes lactis a la seva dieta. Els pot consumir en quantitats petites i combinar-los amb altres aliments. A més, hi ha productes lactis que contenen nivells baixos de lactosa o que han estat tractats per reduir-ne el contingut de lactosa, com certs tipus de formatge madurat, iogurt amb cultius vius i la mantega.

6.7 El creixement actual del mercat de productes sense lactosa

En els últims anys, la indústria alimentària s'ha transformat a causa del creixent consum de productes sense lactosa. Aquesta tendència és impulsada per la demanda de persones amb intolerància a la lactosa, al·lèrgies i aquells que volen una dieta més saludable. Els consumidors, conscients del seu benestar, busquen alternatives sense lactosa als productes lactis convencionals i aquest canvi en els hàbits de consum ha tingut un impacte significatiu en la producció i comercialització d'aliments.

L'adquisició i consum de productes sense lactosa està en augment, i les empreses s'adapten i desenvolupen productes innovadors per atraure un públic més ampli. Aquest canvi en la indústria alimentària presenta oportunitats i reptes, i és necessari continuar amb la recerca i desenvolupament per satisfer les demandes d'acord amb l'evolució del mercat.

La magnitud del mercat mundial de productes sense lactosa es preveu que augmenti de forma notable, passant de 12,33 mil milions de dòlars el 2022 a 14,07 mil milions de dòlars en concloure el 2023, amb una taxa de creixement anual composta (CAGR)

del 14,1% (The Business Research Company, 2022). No obstant això, aquest creixement s'ha vist afectat per la confrontació entre Rússia i Ucraïna, la qual ha interromput les perspectives de recuperació econòmica global després de la pandèmia de COVID-19, almenys a curt termini. Malgrat aquest context desafiador, s'estima que el mercat mundial de productes sense lactosa continuarà expandint-se de manera significativa en els propers anys. Es preveu que la seva grandària augmenti fins a arribar als 22,69 mil milions de dòlars el 2027, amb una CAGR del 12,7% (The Business Research Company, 2022). Aquestes dades reflecteixen les oportunitats potencials que ofereix aquest mercat en expansió i destaquen la importància de desenvolupar estratègies adequades per aprofitar aquest creixement i fer front als reptes que es presenten. És fonamental que les empreses analitzin de manera exhaustiva aquestes tendències i adaptin les seves estratègies comercials per satisfer la demanda creixent de productes sense lactosa a escala global.

El mercat “sense lactosa” espanyol cada vegada adquireix una dimensió més gran. Al 2022 va assolir els 466 milions d'euros, amb un creixement del 9,2%, com bé es pot comprovar a la Figura 11, molt per sobre del creixement del mercat global de productes lactis (llet i derivats lactis) que va ser del 4% (MAPA, 2023).

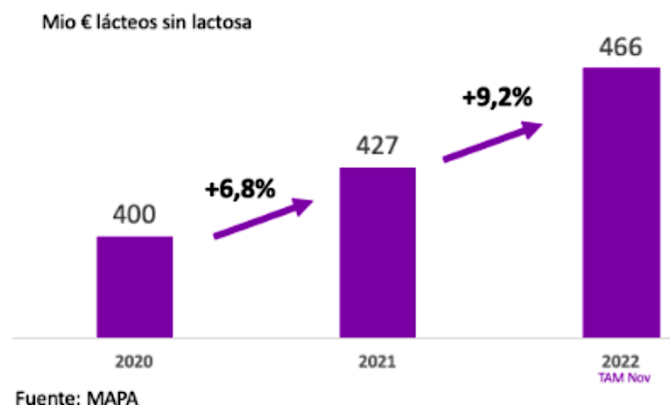


Figura 11: Tendència del mercat de productes sense lactosa a Espanya (Font: MAPA, 2023).

La llet sense lactosa és la categoria de més magnitud, amb 357 milions d'euros. Representa el 13% dels litres de llet envasada al nostre país i, en termes de valor, arriba gairebé al 15% de participació en el mercat. És important destacar que, de mitjana, aproximadament el 18% dels consumidors adquireix mensualment aquest

tipus de llet. Pel que fa al formatge sense lactosa, té un valor proper als 55 milions d'euros i es posiciona com la segona categoria en l'àmbit lacteri "sense lactosa". Aquest any ha superat els iogurts gràcies a un creixement de vendes del +34%. Aproximadament el 4% dels consumidors adquireix mensualment aquest tipus de formatges. Finalment, els iogurts i llets fermentades sense lactosa suposen 54 milions d'euros, experimentant un creixement del +14% el 2022. Al voltant del 5,5% dels consumidors adquireix mensualment aquests productes sense lactosa (MAPA, 2023).

7. Lactasa

Tal com s'ha esmentat abans, la lactasa és l'enzim encarregat de la hidròlisi de la lactosa. A la Figura 12 es mostra la localització de la lactasa en un epíteli normal i l'epíteli d'un individu amb intolerància a la lactosa (Gómez-Rodríguez, 2019). El metabolisme de la lactosa comença a la boca, on es produeix una petita quantitat de lactasa a la saliva. Tot i això, la major part de la digestió de la lactosa es realitza a l'intestí prim (Figura 12), on els dos monòmers provinents de la hidròlisi s'absorbeixen a través de la mucosa intestinal i entren a la sang per transportar-les a les cèl·lules del cos (Romero-Velarde *et al.*, 2019).

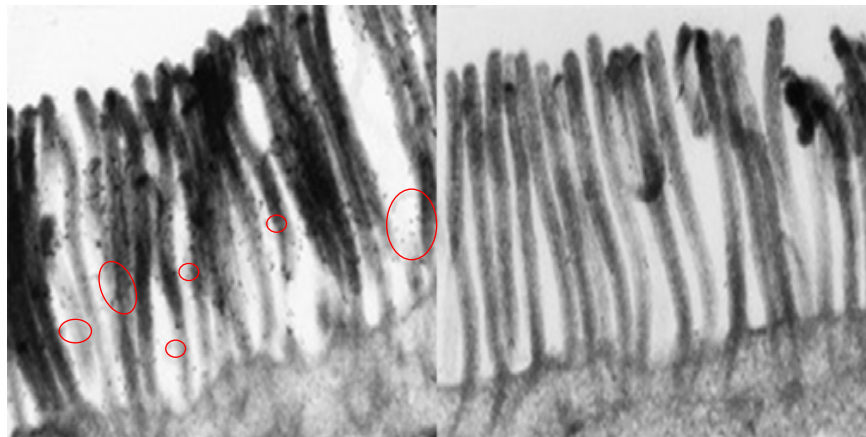


Figura 12: A l'esquerra, la lactasa present a la superfície apical dels enteròcits a les microvellositats de l'intestí prim, majoritàriament en el jejú proximal. A la dreta, la mateixa imatge presa en un individu amb deficiència de lactasa. Font: Gómez-Rodríguez (2019).

La lactasa madura en humans és una glicoproteïna integral composta per dues cadenes polipeptídiques extracel·lulars idèntiques de 160 kDa (Skovbjerg *et al.*, 1981; Szilágyi, 2019). Estructuralment, és una proteïna globular que es plega en un domini

N-terminal gran i un domini C-terminal més petit. L'expressió del gen de la lactasa és regulada mitjançant una interacció complexa de factors genètics i moleculars.

L'ancoratge a l'intestí s'aconsegueix mitjançant aminoàcids hidrofòbics a l'extrem C-terminal de l'enzim, els quals s'uneixen a la membrana hidrofòbica lipídica. Els aminoàcids hidrofílics intraluminals creen dos llocs catalítics actius. La lactasa presenta quatre dominis estructurals homòlegs, cadascun dels quals s'encarrega d'organitzar l'enzim intramolecularment (Szilágyi, 2019). En realitat, es tracta d'una lactasa-floricina hidrolasa o LHP (EC 3.2.1.23-3.2.1.62). Segons l'homologia de seqüència, la lactasa està composta per dues regions diferents, anomenades III i IV, que són similars a les glicosidases de la família 1. L'enzim té dos llocs catalítics actius, que es troben orientats cap a la part interna de la cèl·lula (llum) i són hidrofílics, és a dir, atrauen les molècules d'aigua. Aquests dos llocs catalítics tenen diferents especificitats de substrat. (Szilagy, 2019).

L'edat, l'alimentació i la composició de nutrients són factors que influeixen en el desenvolupament de l'activitat de la lactasa intestinal. Tot i que els nadons prematurs tenen una "deficiència de lactasa" relativa, els símptomes d'intolerància a la lactosa són poc comuns i, per tant, no estan contraindicats (Romero-Velarde et al., 2019).

El gen que codifica la producció de l'enzim (gen LCT) se situa al braç llarg del cromosoma 2 (Figura 13) i consta de 17 exons (Szilagy, 2019). La regulació de l'expressió de lactasa té lloc majoritàriament a nivell transcripcional, és a dir, la regulació de la seva expressió (la quantitat de proteïna lactasa produïda) es produeix principalment a través dels processos que afecten la síntesi de l'ARNm, com l'activitat dels factors de transcripció. D'aquesta manera, l'expressió selectiva de lactasa és controlada per factors de transcripció específics a la regió intestinal (Szilagy, 2019).

Té un pH òptim de 6,0. El valor de K_m (constant de Michaelis-Menten) per a la lactosa és de 20 mM, la qual cosa ens indica la concentració de substrat necessària per assolir la meitat de la velocitat màxima de l'enzim (Estrada et al., 2014).

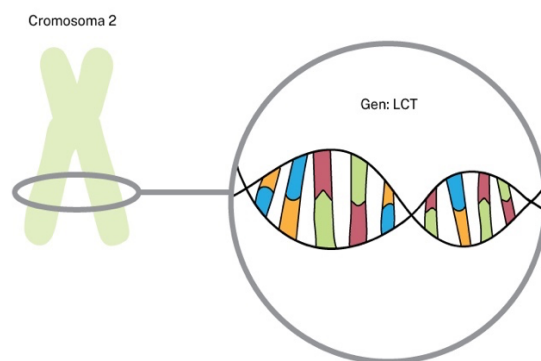


Figura 13: Ubicació del gen LCT en el cromosoma 2. Font: ADNInstitut (2020).

Tanmateix, l'estructura de l'enzim difereix en funció de la font. Així, la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (una de les principals fonts comercial de lactasa) és un enzim tetramèric en l'estructura cristal·lina, el que significa que està composta per quatre molècules que formen una unitat asimètrica. La subunitat β -galactosidasa es plega en cinc dominis diferents, cadascun amb característiques i funcions específiques, tal i com es mostra en la Figura 14 (Pereira-Rodríguez *et al.*, 2011):

- Domini 1, està involucrat en la unió i reconeixement de sucres.
- Domini 2 i Domini 4, tenen un paper en l'estabilitat de la proteïna o en interaccions amb altres molècules, a causa del seu plegament tipus sandvitx.
- Domini 3, on es troba la butxaca catalítica, és a dir, la regió on ocorre la reacció química catalitzada per l'enzim.
- Domini 5, que es classifica com una cadena petita de β -galactosidasa. Probablement exerceixi una funció especialitzada o jugui un paper en l'estabilitat o regulació de l'enzim.

A més, hi ha dues regions que no es poden assignar a cap dels dominis prèviament descrits:

1. Regió N-terminal.
2. Enllaç exposat al solvent entre els dominis 4 i 5, és un petit segment de la proteïna que connecta els dos dominis.

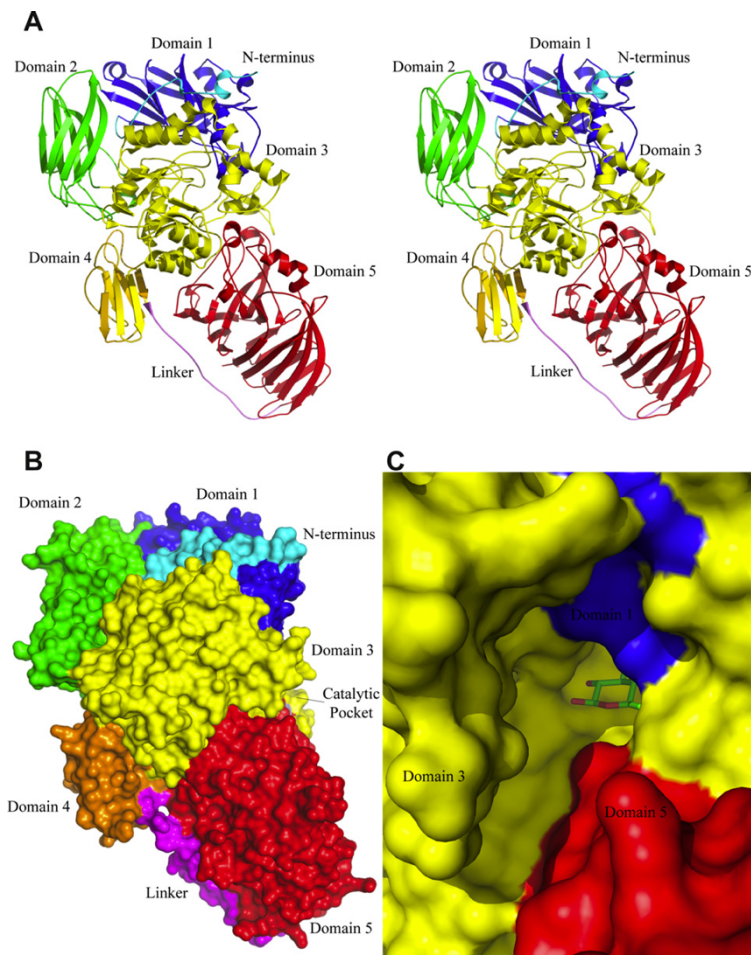


Figura 14: Estructura d'una lactasa de *Kluyveromyces lactis* (KL-b-Gal) amb els diferents dominis. (a) Vista estereoscòpica del monòmer KL-b-Gal en representació de dibuix animat. Els dominis es representen amb colors diferents. La regió N-terminal (cian), domini 1 (blau), domini 2 (verd), domini 3 (groc), domini 4 (taronja), linker (magenta) i domini 5 (vermell). (b) Representació de superfície del monòmer amb els dominis de colors seguint el mateix esquema. (c) Vista ampliada de l'entrada de la butxaca catalítica. Es mostra en representació de bastonets una galactosa lligada al lloc actiu. Font: (Á. Pereira-Rodríguez et al., 2011)

Al lloc actiu, es produeix una interacció entre certs residus aminoacídics de la lactasa i els enllaços químics específics de la lactosa, aquests aminoàcids són els residus catalítics, en particular Glu482 i Glu551 a la lactasa humana. Aquests residus catalítics actuen com a àcids i bases en la reacció, donant o acceptant protons per facilitar la ruptura de l'enllaç glucosídic que uneix la glucosa i la galactosa a la lactosa. La lactasa hidrolitza aquest enllaç, alliberant les dues molècules monosacàrids, glucosa i galactosa, que després poden ser absorbides i utilitzades per l'organisme. (Pereira-Rodríguez et al., 2011).

7.1 L'ús de la lactasa en l'àmbit industrial

La tecnologia de producció de lactasa fa referència al procés utilitzat per produir l'enzim lactasa a gran escala. Aquesta tecnologia és molt important a la indústria alimentària, ja que és la principal estratègia per obtenir productes sense lactosa.

A finals dels anys 60, es va introduir comercialment la primera lactasa de llevat derivada de *Kluyveromyces lactis*, la qual es va convertir en un producte disponible per al consumidor (Wang et al., 2020). L'ús de llevats (principalment *Kluyveromyces lactis* però també *Saccharomyces lactis*, *S. fragilis* i *Torula cremoris*), fongs (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*) i bacteris (*Streptococcus thermophilus*, entre d'altres) són les principals fonts en la producció de lactasa. Aquests microorganismes es cultiven en grans fermentadors, on les condicions de creixement són optimitzades per a estimular la producció de lactasa. Una vegada obtingut el cultiu microbià, l'enzim és separat i purificat per a la seva utilització comercial (Bello, 2009). Les lactases derivades d'*Aspergillus* són més adequades per a la hidròlisi de la lactosa en condicions àcides, mentre que les lactases de llevat funcionen millor en un pH neutre (Wang et al., 2020).

7.1.1 Tecnologia de producció industrial de lactasa

Les tecnologies de producció de lactasa fan referència als mètodes utilitzats per produir l'enzim lactasa a gran escala.

Trobem diverses fonts per obtenir lactasa. Les mes reconegudes i utilitzades inclouen:

1. Utilitzar **microorganismes** productors de lactasa naturalment. Les lactases se solen obtenir de fonts microbianes i la seva purificació és un procés costós. També es poden utilitzar cèl·lules senceres de bacteris làctics, com *S. thermophilus*, d'ús alimentari com a alternativa a la lactasa purificada. Les cèl·lules d'*S. thermophilus*, tractades amb el pèptid antimicrobià nisina, són capaces d'hidrolitzar eficientment la lactosa, i permet la producció de productes lactic sense lactosa i amb una etiqueta neta, sense necessitat

d'utilitzar enzims comercials o microorganismes recombinants (Wang et al., 2020).

2. Extracció lactasa de **teixits animals** a partir de teixits que contenen altes concentracions de l'enzim. Per exemple, es poden extreure petites quantitats de lactasa a partir de l'intestí prim d'animals com ara vaques (Bello, 2009). No obstant, aquesta font de lactasa és menys habitual a causa dels seus elevats costos i la seva disponibilitat limitada (Grace et al., 2017).
3. **Cultius** de cèl·lules animals, com ara cèl·lules d'intestí prim d'animals, per produir lactasa, i es cultiven perquè produeixin l'enzim (Bello, 2009). Les lactases se solen obtenir de fonts microbianes i la seva purificació és un procés costós. També es poden utilitzar cèl·lules senceres de bacteris làctics, com *S. thermophilus*, d'ús alimentari com a alternativa a la lactasa purificada. Les cèl·lules d'*S. thermophilus*, tractades amb el pèptid antimicrobià nisina, són capaces d'hidrolitzar eficientment la lactosa, i permet la producció de productes lacticis sense lactosa i amb una etiqueta neta, sense necessitat d'utilitzar enzims comercials o microorganismes recombinants (Wang et al., 2020).
4. **Producció enzimàtica recombinant**, introduint gens que codifiquen la lactasa en microorganismes o altres sistemes de producció, permeten obtenir grans quantitats de lactasa (Santillán-Doherty et al., 2020).

Així doncs, en la producció de lactasa s'utilitzen diferents tecnologies i enfocaments, com ara la fermentació microbiana i l'extracció de fonts naturals. També podem trobar tecnologies com l'enginyeria genètica, modificar gens que puguin ser responsables d'alteracions funcionals en éssers vius, incloent-hi éssers humans. (Wang et al., 2020).

Una de les fonts més importants per l'obtenció de lactasa es la enginyeria genètica. L'enginyeria genètica es compon de diverses eines i tècniques que permeten la realització de modificacions precises a l'ADN, incloent l'addició, eliminació i alteració

de segments específics. Aquesta modificació genètica permet als microorganismes produir l'enzim lactasa en quantitats significatives (Santillán-Doherty *et al.*, 2020).

El desenvolupament de l'enginyeria genètica fa possible la producció industrial a gran escala de lactasa amb una activitat enzimàtica més alta i una producció més elevada. Un cas de millora de rendiment i qualitat utilitzant la tecnologia de l'ADN recombinant el va realitzar Domingues *et al.* (2000), amb la construcció de soques recombinants de *Saccharomyces cerevisiae* amb el gen *lacA* procedent d'*Aspergillus niger*, el que va resultar en una gran producció de quantitat de lactasa. Es va avaluar un protocol clàssic de mutagènesi química per augmentar la producció de β -galactosidasa per part de bacteris probiòtics per millorar el seu potencial per tractar els símptomes de la malabsorció de lactosa en humans (Shiying *et al.*, 2014). Per expressar la lactasa d'*A. niger* al llevat, el gen codificador de *lacA*, es va acoblar al promotor ADH1 al plasmidi multicòpia que també portava el gen marcador de resistència al coure, CUP1. La construcció del plasmidi pLD1 es descriu a la Figura 15 (Domingues *et al.*, 2000).

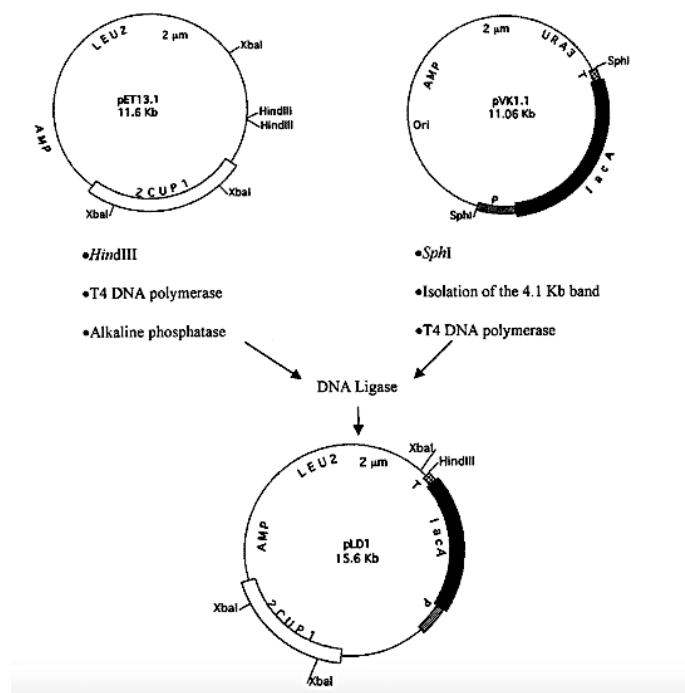


Figura 15: Construcció del plasmidi recombinant pLD1 que conté el marcador seleccionable CUP1 i el gen codificador de la β -galactosidasa d'*Aspergillus niger*, *lacA*, expressat des del promotor ADH1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Font: Domingues *et al.* (2000).

Aquesta lactasa derivada de microorganismes recombinants ha de ser avaluada d'acord amb la Guia per a la realització de l'avaluació de la seguretat dels aliments produïts amb microorganismes recombinants d'ADN (Domingues et al., 2000). Aquesta guia (CAC/GL 46-2003) aborda els aspectes institucionals i d'innocuitat dels aliments produïts mitjançant l'acció de microorganismes d'ADN recombinant. S'hi inclouen aliments i ingredients d'aliments que contenen microorganismes d'ADN recombinant viables o no viables, o poden haver-se produït mitjançant fermentació amb microorganismes d'ADN recombinant amb posterior extracció d'aquests microorganismes (Font: Fao.org, 2023).

Generalment, la lactasa obtinguda per enginyeria genètica pot tenir més puresa i consistència que la lactasa microbiana, la qual cosa pot fer-la més efectiva en alguns casos. Tot i això, l'eficiència de cada tipus de lactasa dependrà de la manera com es produeix i s'utilitzi (Grace et al., 2017).

Per millorar el rendiment i la qualitat de l'enzim, s'han emprat tècniques de mutagènesi dirigida al lloc, fusió de protoplasts i ADN recombinant (Grace et al., 2017).

1. **Mutagènesi dirigida al lloc:** tècnica utilitzada per introduir canvis específics a l'ADN d'un gen o un enzim en particular en una posició determinada. L'estudi realitzat per Marten et al. (2022) es va enfocar a investigar l'impacte de variants genètiques específiques del gen LCT a la proteïna LPH. Aquestes variants es van generar mitjançant mutagènesi dirigida al lloc per tal d'analitzar-ne els efectes en les característiques de la proteïna, tot introduint canvis específics al gen LCT i generar les variants desitjades de la proteïna LPH.
2. La **fusió de protoplast** és una tècnica utilitzada en biologia i biotecnologia per combinar cèl·lules eliminant les parets cel·lulars, cosa que resulta en la formació de cèl·lules híbrides. Han estat tractades enzimàticament deixant només la membrana plasmàtica intacta. Aquesta tècnica s'ha utilitzat per construir híbrids entre soques de llevat amb característiques específiques. En aquest cas, es van fusionar protoplasts de soques de *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces fragilis*. La fusió de protoplasts va permetre la formació de fusants, que són

cèl·lules resultants de la fusió de protoplasts. Els fusants van ser capaços de fermentar lactosa i generar etanol (Farahnak et al., 1986).

3. La tècnica de **l'ADN recombinant** és un conjunt de tècniques utilitzades per manipular i combinar fragments d'ADN de diferents fonts per crear molècules d'ADN modificades artificialment. A les Taules 6 i 7, respectivament, es presenten diferents exemples de sistemes microbians per a la producció de β -galactosidasa recombinada i algunes de les seves aplicacions.

Taula 15: Alguns sistemes microbians recombinants per a la millora de la producció de β -galactosidasa. Font: Modificat de Oliviera et al. (2011).

<p>Expressió recombinant de β-galactosidases bacterianes <u>no</u></p>	<p>Producció heteròloga de β-galactosidasa d'<i>Aspergillus niger</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - La β-galactosidasa segregada pel fong filamentós <i>A. niger</i> és adequada únicament per a la hidròlisi de sèrum àcid, ja que la seva activitat es veu considerablement reduïda a valors de pH superiors al punt òptim, al voltant de 3.5. <p>Amb el propòsit de millorar la disponibilitat d'aquest enzim i aprofitar-lo en aplicacions específiques, es va realitzar el clonatge i la producció de la β-galactosidasa d'<i>A. niger</i> en soques recombinades de <i>S. cerevisiae</i>.</p> <p>Per fer-ho, es va fer servir un vector d'expressió multicòpia de llevat, el qual portava el ADN corresponent a la β-galactosidasa secretora d'<i>A. niger</i>.</p> <p>Posteriorment, es va procedir a dissenyar diferents soques de <i>S. cerevisiae</i> utilitzant aquest vector, amb l'objectiu d'aconseguir la producció i secreció de la β-galactosidasa d'<i>A. niger</i>. En els primers estudis, els recombinants van presentar baixes taxes de creixement.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Posteriorment es va aconseguir obtenir soques de llevat recombinant amb capacitat de floculació que secreten nivells elevats de la β-galactosidasa d'<i>A. niger</i>, utilitzant una soca de llevat de cervesa transformada amb un vector recombinant. Aquestes millores van permetre un augment significatiu en la productivitat i estabilitat de la β-galactosidasa recombinant, cosa que va resultar en una major eficiència en la producció a gran escala - Actualment, les β-galactosidases produïdes per <i>A. niger</i> no generen preocupacions i estan destinades a ser utilitzades en el processament del sèrum de la llet. Les proves de genotoxicitat no van plantejar preocupacions de seguretat, i per tant el fan apte per l'ús.
--	--

<p>Expressió recombinant de β-galactosidases bacterianes</p>	<p>Producció heteròloga de β-galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - La β-galactosidasa de <i>K. lactis</i>, codificada pel gen LAC4, té un gran interès biotecnològic en la indústria alimentària i en la reutilització del sèrum de formatge. A diferència d'<i>A. niger</i>, el llevat <i>K. lactis</i> produeix una quantitat més gran d'unitats enzimàtiques, encara que la producció industrial i l'aplicació de la β-galactosidasa de <i>K. lactis</i> es veuen limitades pels costos associats a la seva extracció i processament. Per tant, s'han adoptat dues estratègies per a la secreció de la β-galactosidasa de <i>K. lactis</i> al llevat: l'ús de soques de llevat amb capacitat de lisi espontània i la utilització de seqüències senyal heteròlogues per a la producció extracel·lular. En ambdós casos, es van emprar plasmidis per a la clonació i expressió de la β-galactosidasa recombinant de <i>K. lactis</i>. - L'estratègia de secreció heteròloga de β-galactosidasa de <i>K. lactis</i> es va investigar utilitzant soques de llevat recombinants. Es van emprar diferents senyals de secreció, com la toxina assassina de <i>K. lactis</i> i el factor α de <i>Saccharomyces</i>, per secretar l'enzim al medi de cultiu. No obstant això, en tots els casos, la secreció de β-galactosidasa recombinant es va aconseguir només al medi de cultiu, no a l'interior de les cèl·lules. - Es van construir proteïnes híbrides combinant β-galactosidases de <i>K. lactis</i> i <i>A. niger</i> amb l'objectiu de millorar la secreció de β-galactosidasa heteròloga a <i>K. lactis</i>. La producció heteròloga de β-galactosidasa de <i>K. lactis</i> mitjançant la secreció extracel·lular de l'enzim ha demostrat ser prometedora en termes de la seva aplicabilitat a la indústria alimentària i a la reutilització del sèrum de formatge. Els avenços en l'enginyeria genètica, l'optimització de les condicions de cultiu i l'exploració de noves estratègies de secreció han contribuït a millorar la producció i l'activitat enzimàtica. - Molts estudis també han informat sobre la seqüenciació genètica d'algunes soques de <i>K. lactis</i>. No obstant això, el més prometedori des d'un punt de vista industrial són els que s'ocupen de l'expressió dels gens d'aquest llevat en altres microorganismes. Per exemple, els procediments d'enginyeria genètica poden reduir la formació de productes d'enfosquiment no enzimàtics en la hidròlisi de la lactosa.
<p>Expressió recombinant de β-galactosidases bacterianes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La β-galactosidasa d'<i>Escherichia coli</i>, codificada pel gen lacZ, és citosòlica i té limitacions en el seu ús biotecnològic a causa de la seva producció intracel·lular i problemes de toxicitat associats amb <i>E. coli</i>. Tot i això, el gen lacZ s'ha clonat en sistemes d'expressió recombinant de llevat, principalment per utilitzar-lo com un gen informador en lloc de la seva producció heteròloga de β-galactosidasa. A més, es va aconseguir alliberar

	<p>β-galactosidasa d'<i>E. coli</i> en soques de <i>S. cerevisiae</i> mitjançant estratègies de lisi espontània o permeabilització química de les cèl·lules.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Maksum <i>et al.</i> (2021) van produir β-galactosidasa en una soca salvatge d'<i>E. coli</i> B130. En general, <i>E. coli</i> podria ser utilitzada com a model per a una millor comprensió del mecanisme catalític de la β-galactosidasa. - Kim <i>et al.</i> (2021) van estudiar l'expressió de LAC4 de β-galactosidasa en <i>E. coli</i> i van avaluar les condicions òptimes de reacció. Aquests autors van informar d'avantatges del mètode, com el baix cost de l'extracció i la possibilitat d'una purificació en un sol pas en un procés comercial.
--	--

Taula 16: Algunes de les aplicacions i avantatges de l'ús de les β -galactosidases recombinants: avantatges en termes dels processos de producció i purificació. Font: Modificat de Oliviera *et al.* (2011)

Aplicacions de les β-galactosidases recombinants	<p>Hidròlisi de lactosa de la llet: La β-galactosidasa adaptada al fred de <i>Pseudoalteromonas</i>, produïda i purificada a partir de cèl·lules d'<i>E. coli</i>, la β-galactosidasa recombinant adaptada al fred de <i>Lactobacillus acidophilus</i>, i la β-galactosidasa recombinant termoestable de <i>Bacillus stearothermophilus</i> són alguns dels exemples que Oliviera <i>et al.</i> (2011) citen en seu article per a la producció de llet sense lactosa. Les lactases recombinants es poden modificar genèticament per augmentar l'activitat enzimàtica, permetent una digestió més eficient de la lactosa.</p>
	<p>Bioremediació del sèrum: s'utilitza lactasa per eliminar la lactosa del sèrum.</p>
	<p>Biosensors i proteïnes de fusió: L'expressió i la producció de β-galactosidases recombinants han estat fonamentals per als avenços en aquesta àrea. Un exemple és l'ús d'una proteïna quimèrica que combina la β-galactosidasa d'<i>E. coli</i> amb el domini d'unió de l'amidasa (acetilmuramoil)-L-alanina d'<i>Streptococcus pneumoniae</i>, la qual va permetre el desenvolupament d'un mètode específic d'immobilització de proteïnes en un elèctrode d'or. L'elèctrode d'or actua com a base on s'ancora la proteïna, permetent així la detecció electroquímica de l'activitat de la β-galactosidasa generant canvis electroquímics observables en l'elèctrode d'or, els quals es poden mesurar i quantificar.</p>
	<p>Producció eficient i econòmica: Gràcies a les tècniques de genètica molecular, les lactases recombinants es poden produir en grans quantitats de manera controlada i reproduïble. Això permet un procés de producció més eficient i econòmic en comparació dels mètodes tradicionals d'extracció de lactases de fonts naturals, com fongs o bacteris.</p>

	<p>Personalització de nous processos: Les tècniques de genètica molecular permeten modificar i optimitzar els enzims lactases per a aplicacions específiques. És possible dissenyar lactases amb propietats desitjables, com ara una major termoestabilitat, tolerància al pH o especificitat.</p>
--	---

Una altra lactasa recombinant i comercial es una que prové de *Kluyveromyces lactis*, que té unes propietats rellevants al mercat. Durant els últims anys, s'han desenvolupat estratègies innovadores per a la selecció i millora de soques de *K. lactis* basades en l'ús de la lactasa com a marcador de selecció per a l'expressió de proteïnes recombinants. S'ha aconseguit augmentar la producció de lactasa, la qual cosa indica una major capacitat per expressar proteïnes d'interès. L'ús de la lactasa com a marcador de selecció permet obtenir soques de *K. lactis* més eficients i productives en la producció de proteïnes d'interès. Aquesta estratègia innovadora ofereix una manera efectiva d'identificar i millorar les soques que presenten un major potencial per expressar proteïnes recombinants, contribuint a l'optimització del procés de producció (Grace et al., 2017).

7.1.2 Tecnologia d'immobilització de lactasa

La immobilització d'enzims és una tècnica utilitzada per fixar enzims a una matriu sòlida o suport, cosa que en permet la reutilització i millora l'estabilitat dels enzims. Aquesta tècnica es fa servir en diversos camps com la biotecnologia, la indústria alimentària, la medicina i la producció de biocombustibles, entre d'altres. A nivell industrial, que consisteix en fixar els enzims o biomolècules a una matriu sòlida, com un gel o una resina, per crear un biocatalitzador que pugui ser reutilitzat. (Bickerstaff, 1997). Aquest procés també pot incrementar la resistència a canvis en les condicions en què es troba l'enzim, com ara pH i temperatura (Grace et al., 2017). En comparació amb els enzims lliures, l'enzim immobilitzat té múltiples avantatges, mostrades a la Taula 5.

Taula 5: Avantatges dels enzims immobilitzats enfront els enzims lliures. Font: Baret (1987) i Grace *et al.* (2017).

Avantatges dels enzims immobilitzats
Capacitat de ser separat fàcilment del substrat i el producte
Utilitzat repetidament durant un període de temps prolongat
Ús continu en reactors de columna i major resistència a les tensions mecàniques
Reducció dels costos i estalvi d'energia, major protecció del medi ambient i producció automàtica i continua

A la Figura 16 es mostren alguns mètodes comuns d'immobilització d'enzims, els quals inclouen l'encapsulació, l'absorció, la unió covalent i l'entrecreuant (Nguyen, 2017).

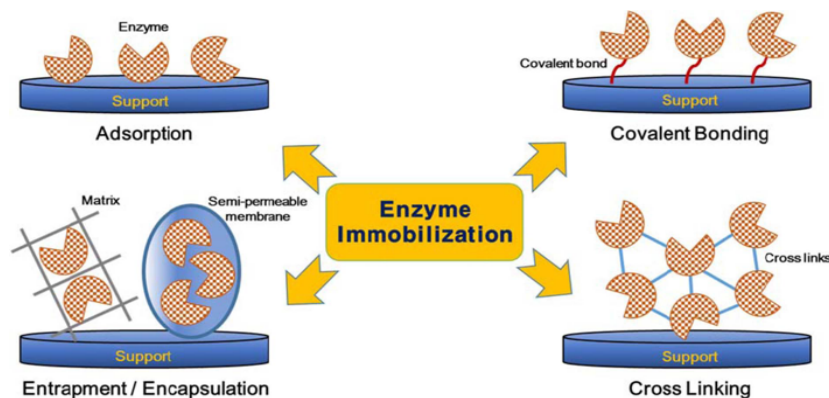


Figura 16: Mètodes d'immobilització d'enzims. Font: Nguyen (2017).

En el mètode d'immobilització anomenat encapsulació (Figura 17), l'enzim no es fixa directament a la superfície de suport sinó que es fa tancant els enzims en una càpsula de membrana (xarxa polimèrica) que només permet el pas dels substrats i els productes, i restringeix la difusió de l'enzim. L'enzim no interacciona químicament amb el polímer de l'encapsulament, de manera que pot millorar l'estabilitat de l'enzim i minimitzar la seva desnaturalització. En aquest mètode, l'eficàcia depèn de l'estabilitat dels enzims dins de la càpsula (Nguyen, 2017).

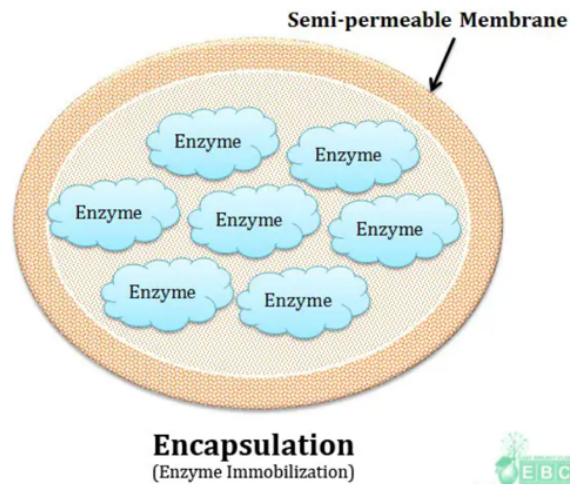


Figura 17: Esquema de l'encapsulació, on es representa l'enzim i la membrana semipermeable.
 Font: <https://www.easybiologyclass.com>

El mètode d'adsorció (Figura 18) és una de les tècniques més simples i eficients en tecnologia d'immobilització. Aquest mètode consisteix en l'adsorció dels enzims en una superfície sòlida, com ara una resina, a través d'interaccions físiques o químiques. Els enzims es barregen en una solució amb el material adsorbent i són retinguts per les forces d'adsorció en la superfície del material. Aquesta superfície té una càrrega neta que permet la formació de ponts d'hidrogen i interaccions de van der Waals entre els enzims i el material adsorbent, mantenint així els enzims fixats a la superfície. Mitjançant aquest mètode, es va aconseguir la immobilització de la lactasa en resina d'intercanvi iònic A568. Les dades de l'estudi evidencien que l'enzim immobilitzat va presentar una activitat superior a l'enzim lliure en totes les temperatures avaluades (Grace et al., 2017).

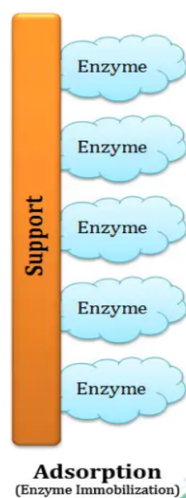


Figura 18: Esquema del mètode d'encapsulació basat en l'adsorció, on es representa l'enzim i el suport (superfície sòlida). Font: <https://www.easybiologyclass.com>

A la tècnica d'immobilització d'enzims coneguda com a unió covalent (Figura 19), es produeix un enllaç químic covalent entre el suport i l'enzim. Aquesta tècnica presenta nombrosos avantatges en la immobilització de lactasa: genera una connexió resistent i duradora entre el suport i l'enzim, una major densitat d'enzims immobilitzats a la superfície del suport (augmenta l'activitat enzimàtica i millora l'eficiència del procés de producció), es millora l'especificitat i la selectivitat de l'enzim, redueix els costos i augmenta la sostenibilitat del procés. La lactasa també s'uneix covalentment a polietilè de baixa densitat (LDPE) per obtenir components d'embalatge actius (Grace et al., 2017).

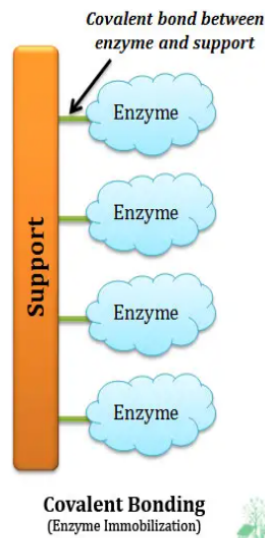


Figura 19: Esquema del mètode d'immobilització basat en la unió covalent, on es representa l'enzim i el suport, però afegint l'enllaç covalent entre enzim i suport. Font: <https://www.easybiologyclass.com>

La immobilització d'enzims per entrecreuament (Figura 20) és un mètode irreversible que es realitza mitjançant la formació d'enllaços entre les molècules d'enzim per enllaços covalents. El procés es duu a terme amb l'ajuda d'un reactiu multifuncional que actua com a connector per connectar les molècules d'enzim en agregats entrecreuats tridimensionals. L'enzim immobilitzat es troba en la mescla de reacció i no està lligat a cap suport. Hi ha dues aproximacions en la immobilització per entrecreuament: l'ús d'agregats d'enzims entrecreuats (CLEA) i el cristall d'enzims entrecreuats (CLEC). Ambdós mètodes requereixen l'ús d'un agent d'entrecreuament, com ara el glutaraldehyd, per entrecreuar les molècules d'enzim a través de les reaccions dels grups amino lliures dels residus de lisina al lloc reactiu de les molècules d'enzim veïnes (Nguyen, 2017).

Abans de descobrir aquest procés d'immobilització, l'ús d'enzims no es trobava generalitzat en els processos químics industrials pel fet que la majoria dels enzims no eren estables en les condicions de treball i, a més, en ser solubles en aigua, la seva separació dels substrats i productes era difícil, per la qual cosa no es podien reutilitzar (Arroyo, 1998).

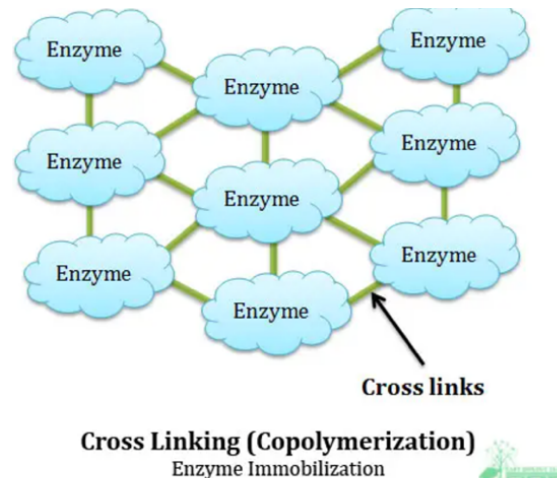


Figura 20: Esquema del mètode d'entrecruament per a la immobilització d'enzims, on es representa l'enzim i l'enllaç creuat entre ells i els que l'envolten. Font: <https://www.easybiologyclass.com>

7.2 Aplicació de la lactasa en la indústria alimentària

L'aplicació de la lactasa a la indústria és la tècnica més utilitzada a l'hora de fabricar productes lliures de lactosa. Tot i que la llet sense lactosa és ben acceptada, aquesta té un gust més dolç causat per la hidròlisi de la lactosa. Aquesta lactosa, en hidrolitzar-se, deixa lliure els dos monòmers i la galactosa com, sobretot, la glucosa són més dolces en la seva forma lliure, i això fa que el poder edulcorant (Taula 6) de la llet sense lactosa augmenti. La galactosa té un grup hidroxil addicional en comparació amb la glucosa, cosa que pot fer que sigui menys dolça (Grace *et al.*, 2017).

Taula 6: Diferents graus de dolçor dels diversos edulcorants. Font: Associació de intolerants a la lactosa Espanya (ADILAC, 2022).

Dulzor relativo	
Fructosa	135
Sacarosa	100
Glucosa	45
Galactosa	42
Lactosa	22

El grau de dolçor d'un sucre fa referència a la intensitat de la dolçor en comparació amb altres sucres o substàncies endolçidores. Es determina en comparació amb el grau de dolçor la sacarosa (sucre de referència), a la qual se li atorga un valor de 100. La dolçor d'un sucre depèn de la capacitat que té per unir-se als receptors de dolçor a la llengua. La lactosa no és tan dolça com la glucosa o la galactosa perquè la seva estructura química no s'ajusta tan bé als receptors de dolçor i té més polaritat a causa de la presència de l'enllaç glicosídic β (1 \rightarrow 4), cosa que redueix encara més la seva capacitat per unir-se als receptors de dolçor en comparació a la glucosa i la galactosa. Cal tenir en compte, però, que algunes marques comercials poden agregar edulcorants o saboritzants a la llet sense lactosa que poden influir en el sabor final (Grace et al., 2017).

Les lactases utilitzen aigua per trencar la lactosa i compten amb tres usos principals: l'elaboració de llet deslactosada, el control de la densitat làctia i faciliten la producció de galactooligosacàrids usats com a prebiòtics (Bello, 2009). La lactasa també s'usa en els concentrats de llet i sèrum làctic, impedit així la cristallització i floculació en els productes finals, gràcies a la hidròlisi de la lactosa. Es recomana hidrolitzar almenys el 20% i fins al 50% de la lactosa present en el producte mitjançant l'addició de lactasa per obtenir productes suaus al paladar (Bello, 2009).

Pel que fa a la llet sense lactosa, el mètode més senzill per produir aquest tipus de producte és l'addició "en lot" de lactasa abans del pas de tractament UHT. La hidròlisi de la lactosa es pot realitzar mitjançant un sistema de lot d'un sol ús, sistemes de recuperació (reutilització d'enzims) o mitjançant l'ús d'enzims immobilitzats (Fiore et al., 2016).

A la Figura 21 es mostra el diagrama de flux típic de la producció de **llet sense lactosa**. Consta de dos processos que comparteixen característiques comunes, però la principal diferència rau en el pas d'addició de lactasa: d'ara endavant, l'addició "a l'envàs" s'indicarà com a procés A i l'addició "en lot" com a procés B. La llet obtinguda mitjançant el procés A conté lactasa activa durant la seva vida útil, ja que l'enzim s'afegeix després de l'esterilització, mentre que la llet obtinguda mitjançant el procés B no té activitat de lactasa perquè l'enzim s'inactiva durant l'esterilització. En conseqüència, la hidròlisi de la lactosa continua durant la seva vida útil en la llet

obtinguda mitjançant el procés A, mentre que en les mostres obtingudes mitjançant el procés B, la hidròlisi s'interromp quan s'ha assolit el nivell final durant la incubació en lot abans de l'esterilització (Fiore et al., 2016). El procés d'afegir lactasa cada envàs (procés A) redueix els costos operatius, ja que requereix una menor quantitat d'enzim i estalvia el temps de retenció necessari per a la hidròlisi en lot. A més, s'evita la necessitat de processos de producció addicionals, garanteix la frescor i la qualitat del producte en cada envàs i permet assolir concentracions més baixes de lactosa (Fiore et al., 2016).

La presència de lactasa activa en l'envàs final a les llets pot tenir alguns inconvenients, ja que l'alta concentració de glucosa i galactosa fa que el producte sigui menys estable en comparació amb la llet UHT convencional. Això es deu a diverses raons. Primerament, l'alta concentració d'aquests sucres pot propiciar la formació de reaccions secundàries, com la caramel·lització o la reacció de Maillard, que generen productes que poden afectar negativament la qualitat i l'estabilitat del producte final. A més, aquests sucres poden interactuar amb altres components presents en el producte, provocant canvis no desitjats i afectant la seva estabilitat. A més a més, l'alta concentració de glucosa i galactosa pot estimular l'activitat enzimàtica, donant lloc a reaccions no desitjades o a la degradació de components importants del producte. (Fiore et al., 2016).

Finalment, aquests sucres també són susceptibles de patir degradació química, com la deshidratació, oxidació i formació de radicals lliures, que poden afectar negativament la qualitat i l'estabilitat del producte final (Fiore et al., 2016).

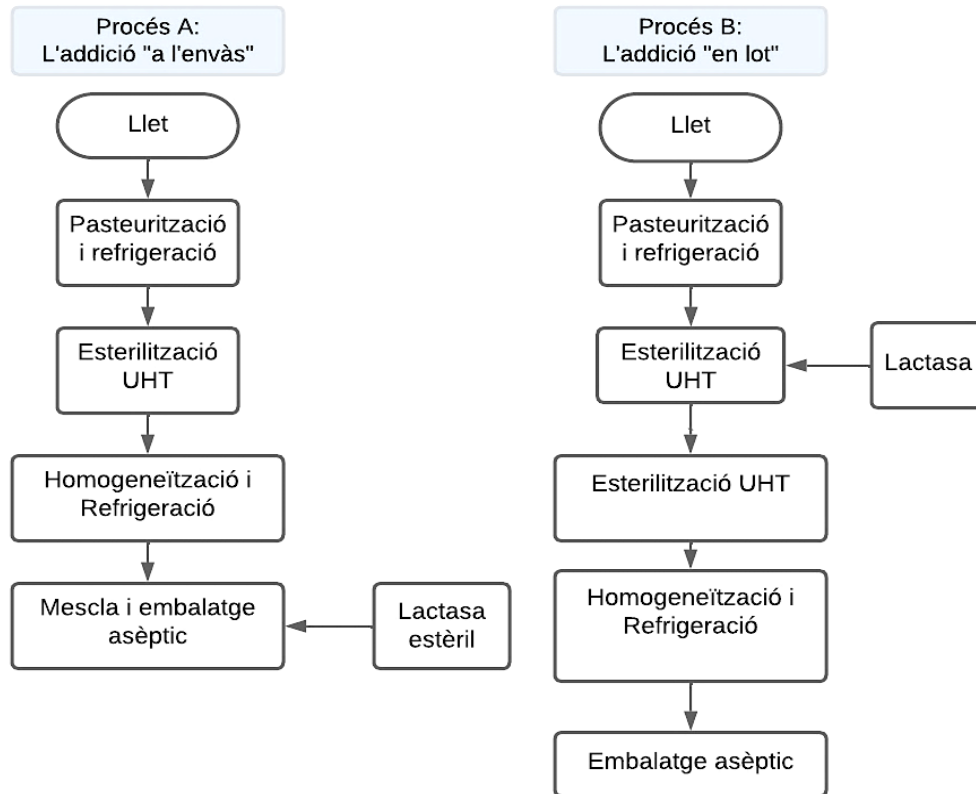


Figura 21: Diagrama dels dos processos típics per a l'obtenció de llet sense lactosa. El procés A correspon a l'addició de lactasa a l'envàs, mentre que el procés B fa referència a l'addició de lactasa en lot. Font: Fiore et al. (2016).

De la mateixa manera passa amb els **iogurts** sense lactosa. La lactasa s'afegeix abans de l'acidificació del iogurt per assegurar una descomposició completa de la lactosa abans que es produeixi la fermentació làctica. És important perquè durant la fermentació làctica, els bacteris làctics consumeixen la glucosa i la galactosa produint àcid làctic, cosa que baixa el pH i acidifica el iogurt. Si la lactosa no s'ha descompost prèviament, podria generar un excés d'acidesa al iogurt i afectar-ne el sabor i la textura (Dekker et al., 2019) (Figura 21). Quan la lactosa s'hidrolitza utilitzant lactasa neutra (lactasa on l'activitat òptima ronda el pH 7), millora significativament l'eficiència del procés de fermentació del iogurt. A més, s'ha observat que aquest procés redueix el temps de coagulació de la llet entre un 35% i un 40%, alhora que augmenta la viscositat del producte, el gust de llet i la qualitat organolèptica (Grace et al., 2017).

El **formatge** es pot elaborar sense lactosa mitjançant la incubació de la llet amb lactasa abans de la coagulació (Figura 22). Això és especialment útil per als formatges joves i frescos, on el contingut de lactosa és significatiu. En els formatges curats, tota la lactosa serà consumida pels bacteris de l'àcid làctic, fent que no sigui tan

necessària la incubació amb lactasa i són productes aptes per a la gent intolerant a la lactosa (Dekker et al., 2019). S'ha observat un temps de maduració més ràpid per al desenvolupament del sabor i la textura, així com un major rendiment de formatge. No obstant això, presenta alguns desavantatges com ara el desenvolupament gustos indesitjats i el gust dolç, entre d'altres (Buddhi, 2012).

Els **gelats** són productes que també es poden fer sense lactosa, utilitzant llet i llet en pols sense lactosa a la mescla de gelat o afegint l'enzim lactasa després de la pasteurització i incubació durant el període d'envelliment abans de la congelació (Figura 22). A causa de l'augment en el contingut de monosacàrids després de la hidròlisi de la lactosa, el punt de congelació de la mescla de gelat disminuirà. Això portarà a un gelat més tou a la mateixa temperatura. Encara que per a alguns postres gelats això pot ser un avantatge, degut a certes característiques buscades en alguns estils culinaris (gelats de *cullera tova*), a vegades també portarà a una fusió més ràpida. (Dekker et al., 2019). Com que la dolçor augmenta a causa de la hidròlisi de la lactosa, el gelater pot decidir disminuir l'addició de sucre i, per tant, augmentar de nou la temperatura de fusió, de manera que pot ser necessari prendre mesures addicionals per complir amb la regulació local dels gelats (Ozatay, 2020). El tractament amb lactasa també s'utilitza en els gelats per prevenir la cristallització de la lactosa, especialment quan s'utilitza sèrum de llet en pols o concentrat de proteïna de sèrum a la mescla de gelat. La quantitat de lactosa pot ser suficientment alta com per formar cristalls durant la congelació. Això condueix a un a una textura sorrenca. El tractament amb lactasa pot prevenir la formació d'aquests cristalls que sensorialment es perceben com a granets de sorra en el gelat, que són més solubles a baixa temperatura. (Dekker et al., 2019).

La llet en pols es pot produir a partir de llet o sèrum que ha estat convertit en lactosa-zero mitjançant el procés de lot (Figura 22). No obstant això, un inconvenient rellevant d'aquest procés és l'alta concentració de monosacàrids presents en la llet tractada, cosa que provoca una disminució de la temperatura de transició vítria i pot generar obstrucció en el sistema d'alimentació del deshidratador per atomització quan les condicions de sequedat no són òptimes. A més, la pols de llet (o sèrum) sense lactosa és altament higroscòpica, el que comporta la formació d'aglomerats durant l'emmagatzematge si no s'empaqueta amb la precaució adequada. A causa d'aquests

desafiaments tècnics, els productes lactis sense lactosa en pols encara representen un mercat reduït en comparació amb els pols de llet convencionals (Dekker *et al.*, 2019).

Els productors de gelats, iogurts i postres congelats també utilitzen la lactasa per millorar la suavitat, cremositat, dolçor, sabor i digestibilitat, i per reduir la textura sorrenca causada per la cristal·lització que passa en preparacions amb alta concentració de lactosa (Ozatay, 2020).

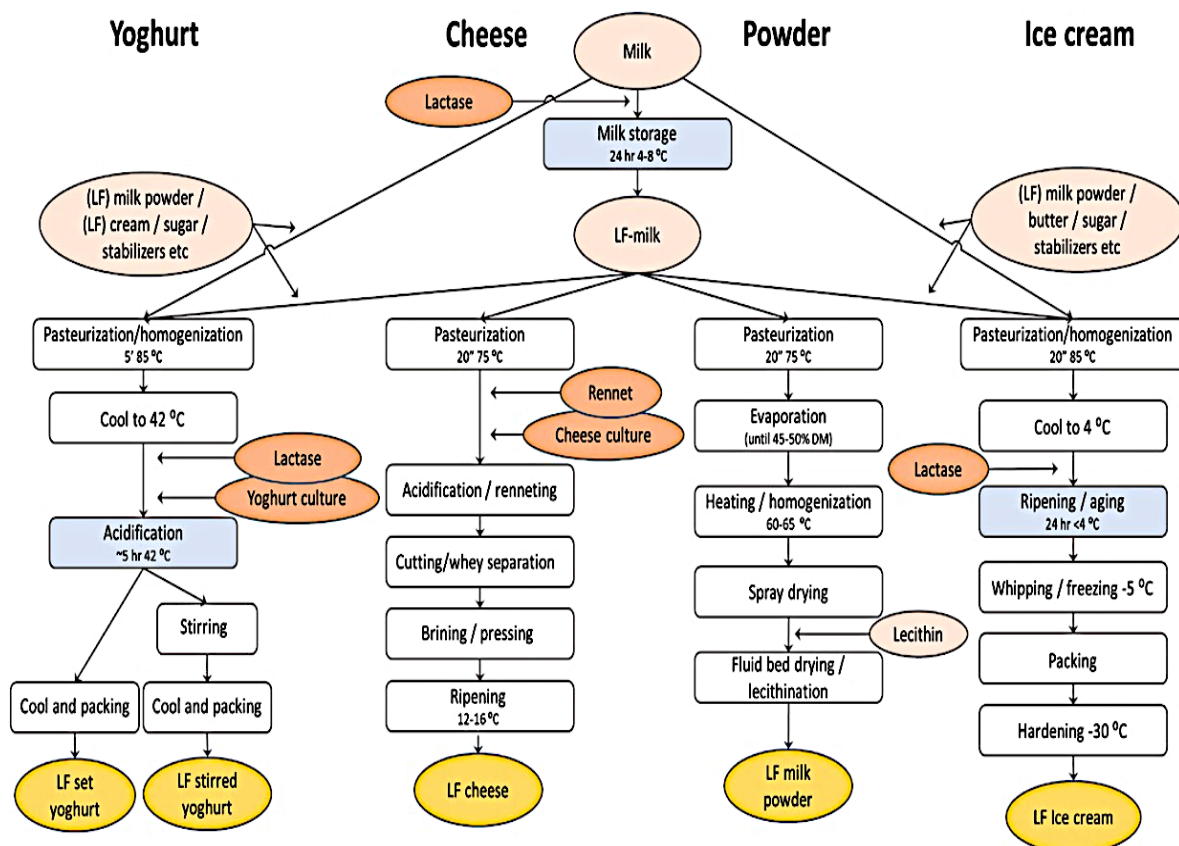


Figura 22: Esquema dels diferents productes lactis tractats perquè acabin sent lliures de lactosa. Font: (Dekker *et al.*, 2019).

Per altra banda, es poden trobar altres productes no lactis on també es pot utilitzar la lactasa en el seu procés. En el pa, la lactosa es pot utilitzar com a agent daurador, i en carns processades com les salsitxes i les hamburgueses, per aconseguir una textura adient. També es pot afegir al pollastre processat i es pot utilitzar en la producció de refrescs (Lomer *et al.*, 2007).

La galactosa resultant de la hidròlisi de la lactosa es polimeritza mitjançant l'acció del mateix enzim, formant galactooligosacàrids amb diferents graus de polimerització, com bé es mostra a la Figura 23, anomenades reaccions de transgalactosilació amb activitat prebiòtica (Zerva et al., 2021). Són resistents a l'àcid i la calor i conserven les seves propietats beneficioses, com ara la millora del restrenyiment, la prevenció del càncer i les al·lèrgies, i afavoreixen el creixement de bacteris, incloent espècies de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* a l'intestí, que són molt importants per a la salut humana. Per tant, l'addició de lactasa a la llet per produir oligosacàrids pot tenir efectes positius en la salut (Buddhi, 2012). D'aquesta manera, les β -galactosidases amb activitat de transgalactosilació generen derivats de lactosa d'alt valor i s'utilitzen a la indústria alimentària com a edulcorants baixos en calories en productes lactis fermentats, aliments prebiòtics, productes de confiteria, aliments a base de cereals, refrescos, pans i begudes (Movahedpour et al., 2021)

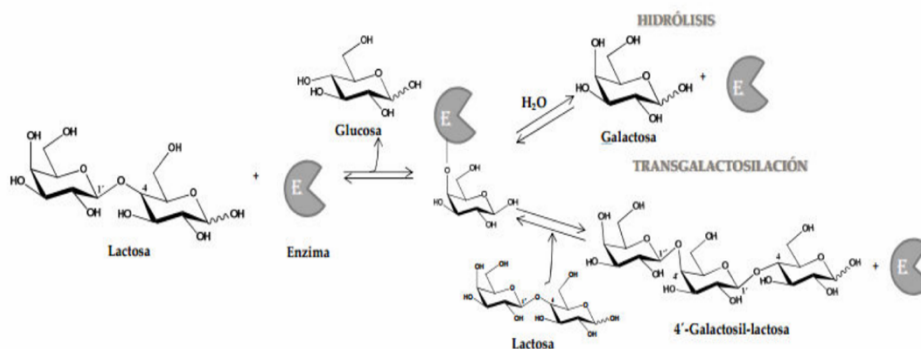


Figura 23: Síntesi de galactooligosacàrids (GOS) mitjançant β -galactosidasa. Font: Rodríguez (2015).

Per altre banda, els envasos amb enzims immobilitzats, a més de protegir els enzims contra factors adversos als quals són susceptibles, poden ser reutilitzats i poden tenir un control de migració, de manera que les característiques i la formulació mateixa de l'envàs permeten controlar la forma en què l'enzim migra: gradualment o ràpidament, o depenent del material, l'enzim pot ser atrapat en la matriu polimèrica, sense migració; en aquest cas, l'envasament actua a través del contacte entre l'envasament i l'aliment (Almasi et al., 2021). L'empaquetatge actiu, en què un component actiu s'incorpora en o sobre un material d'embalatge amb l'objectiu de millorar la seguretat,

l'economia i la vida útil dels aliments envasats, pot oferir un sistema alternatiu per produir productes de llet fluida sense lactosa (Wong, D., & Goddard, J. M., 2014). Els avenços en l'empaquetatge actiu amb enzims immobilitzats per a productes lactis tenen com a objectiu reduir les característiques sensorials negatives del processament per lots (Goddard *et al.*, 2007; Mahoney *et al.*, 2013). Un d'aquests envasos actius es va crear mitjançant la deposició capa a capa de lactasa, en què la lactasa s'immobilitzava de manera covalent sobre una superfície de polietilè de baixa densitat (LDPE) funcionalitzada amb UV entre capes de deposicions repetides de polietilenoimina (PEI) i capes de reticulació amb glutaraldehid (GL) (Wong *et al.*, 2013). L'objectiu de la tecnologia d'embalatge actiu amb lactasa immobilitzada és vincular la lactasa al LDPE mitjançant una unió covalent. Aquest tipus d'embalatge es considera adequat per a l'aplicació de la lactasa a la indústria alimentària i s'utilitza freqüentment.

8. Problemes: intolerància i al·lèrgia

Tant la intolerància com l'al·lèrgia són respostes adverses del cos a certes substàncies, però existeixen diferències significatives entre ambdues. La intolerància és una resposta adversa que es produeix quan el cos té dificultats per digerir certes substàncies, com en aquest cas seria la lactosa. Però, en general, la intolerància no és perillosa i pot ser gestionada mitjançant canvis en la dieta o l'ús de suplementos enzimàtics. Tot i que els símptomes poden ser incòmodes, com ara dolor abdominal, gasos i diarrea, no solen ser greus (Gómez-Rodríguez, 2019). No s'ha de confondre el terme intolerància amb malabsorció; el terme malabsorció de lactosa significa que la lactosa no és absorbida, mentre que intolerància a la lactosa es refereix a l'aparició de símptomes clínics originats per la malabsorció. Ja que no tots els pacients amb malabsorció de lactosa presenten símptomes, el terme intolerància a la lactosa no és sinònim de hipolactàsia o de malabsorció de lactosa (Gómez-Rodríguez, 2019).

D'altra banda, l'al·lèrgia és una resposta adversa del sistema immunitari a una substància estranya, que pot ser inofensiva per a la majoria de persones. Quan una persona amb al·lèrgia entra en contacte amb la substància a la qual és al·lèrgica, el seu cos reacciona produint una resposta immunitària que pot ser lleu o greu, i fins i tot posar en perill la seva vida. Els símptomes poden incloure picor, erupcions

cutànies, inflor, problemes respiratoris, anafilaxi i altres símptomes greus (Biblioteca Nacional de Medicina, 2020).

8.1 Intolerància a la lactosa

La intolerància a la lactosa i els seus símptomes han captat l'interès de la comunitat científica ja que es considera un problema de salut a nivell mundial, degut a que afecta a gran part de la població. Des d'una perspectiva social, adquirir una comprensió més precisa sobre la lactasa i comprendre les conseqüències de la seva deficiència és crucial per entendre i abordar la intolerància a la lactosa de manera efectiva.

En termes generals, s'ha observat una freqüència d'intolerància més alta a la lactosa en poblacions amb una història limitada en el consum de productes lactis; per contra, en les regions on els lactis han estat fonamentals en l'alimentació, la prevalença d'intolerància a la lactosa a la població ha estat baixa (Figura 24). Els individus que mantenen la capacitat de digerir la lactosa gràcies a la lactasa intestinal es denominen com a portadors del fenotip de persistència de lactasa (LP), sent aquest el fenotip més conegut. Per altra banda, aquells que perden l'habilitat de digerir grans quantitats de lactosa en un sol menjar durant l'edat adulta s'anomenen com a portadors del fenotip de no persistència de lactasa (LNP) (Szilagyi, 2019).

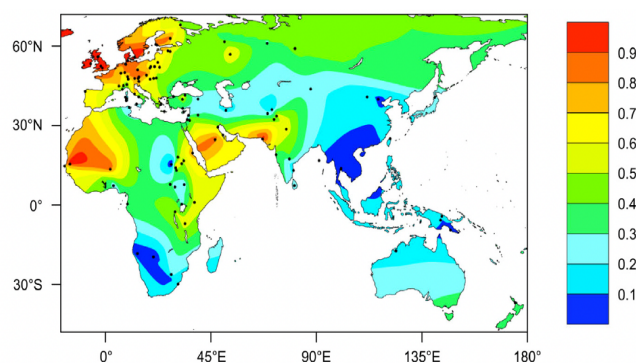


Figura 24: Mapa extret de l'article "L'evolució de la digestió de la lactosa" de Catherine Walker i Mark G. Thomas (2019) que il·lustra que les àrees taronges i vermelles, corresponents al nord d'Europa, el sud-oest de l'Iran, l'Àfrica occidental i l'Aràbia Saudita, exhibeixen una alta prevalença de lactasa persistent (LP) entre la seva població, la qual cosa es relaciona amb la pràctica de consum de productes lactis. Per contrast, les àrees verdes i blaves representen regions geogràfiques on la majoria d'individus no tenen la capacitat de pair la lactosa a l'edat adulta. Font: Szilagyi (2019).

Com a curiositat, la domesticació del bestiar va tenir un paper clau en la persistència de la lactasa en adults, la qual cosa es deu a dos factors crítics. En primer lloc, la domesticació simultània de bacteris làctics que converteixen la lactosa no digerible en

àcid làctic d'absorció fàcil (millorar la digestibilitat de la lactosa). Aquest procés implica l'adaptació de diverses espècies que evolucionen conjuntament per beneficiar-se mútuament i esdevenir dependents les unes de les altres. En segon lloc, la mutació que produeix la persistència de la lactasa en adults de les societats lleteres, especialment aquelles del nord d'Europa i els seus descendents. Això resulta en una taxa d'intolerància a la lactosa significativament més baixa en comparació amb les poblacions del sud d'Europa o asiàtiques, degut a l'evolució genètica que ha permès la producció d'aquest enzim en edat adulta (Fassio *et al.*, 2018).

8.1.1 Fenotips i genotips

La capacitat d'un individu per produir lactasa persistent (LP) o no persistent (LNP) està determinada per un gen situat en una regió promotora de l'ADN que controla l'activitat de la lactasa. Aquest gen s'anomena LCT i a la majoria dels lactants experimenta una regulació a la baixa una vegada que es produeix el deslletament. Tot i ser un fenomen comú a la majoria dels mamífers i éssers humans, no és un fenomen que ocorre per igual a tots els individus humans (Wanes *et al.*, 2019). La Figura 25 mostra les diferències a nivell d'expressió el gen LCT.

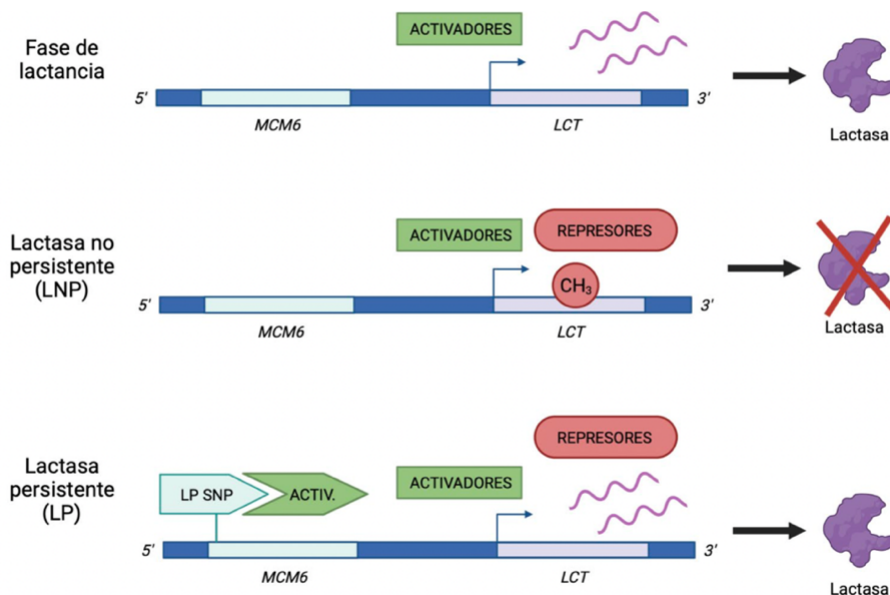


Figura 25: Adaptació dels mecanismes de regulació de l'expressió del gen LCT. Es pot observar que la lactasa no persistent (LNP), existeixen unions de repressors al gen que impedeixen la correcta regulació de l'expressió del gen. En aquest cas, a causa de la metil·lació del DNA (CH₃) es regula de manera negativa l'expressió del gen que codifica la lactasa. Font: PROJETE NATURA, Universitat de València (2021).

S'han identificat diversos polimorfismes (variacions) en aquest gen que afecta la producció de lactasa i que estan associats amb la intolerància a la lactosa en diferents poblacions (Szilagyi, 2019). L'herència d'aquest gen segueix un patró mendelià on hi ha la forma dominant (LP) i la forma recessiva (LNP). Si un individu hereta un o tots dos al·lels dominants per a la producció de lactasa persistent (LP), tindrà la capacitat de produir lactasa durant tota la vida, mentre que si hereta dos al·lels recessius per a la producció de lactasa no persistent (LNP), no podrà pair la lactosa a l'edat adulta (Wanes et al., 2019). A la Figura 26, es mostren de manera resumida els termes utilitzats per descriure l'estat de la digestió de la lactosa.

Terme	Definició
Persistència de lactasa (LP)	Un tret genètic dominant normalment associat amb nivells elevats continuats de producció de lactasa fins a l'edat adulta.
No persistència de lactasa (LNP)	Un tret genètic recessiu i ancestral associat amb una disminució de la lactasa intestinal fins a <10 u/g de teixit en algun moment entre el final del deslletament i l'edat adulta.
Deficiència de lactasa (LD)	Reducció de l'enzim lactasa intestinal per qualsevol causa, ja sigui genètica (LNP) o qualsevol causa secundària, com ara malalties o lesions de la mucosa de l'intestí prim proximal.
Mal digestió de la lactosa (LM)	Incapacitat per digerir la lactosa per qualsevol motiu, LNP primari, però també causes secundàries. Les proves més comunes per a la deficiència de lactasa són en realitat per a LM.
Intolerància a la lactosa (LI)	Síntomes adversos derivats de la ingestió de lactosa, incloent flats, gasos, inflor, rampes, diàrrea i, rarament, vòmits. LI pot ocórrer sense LM.
LI autoinformada (SRLI)	Persones que es creuen intolerants a la lactosa sense fer proves de LM. Nocebo i les característiques psicològiques poden tenir un paper en l'evitació de la llet.
Sensibilitat a la lactosa (LS)	Síntomes adversos amb o sense símptomes de LI i també poden incloure depressió, mal de cap i fatiga, amb o sense LM. Els símptomes del LS poden solapar-se amb la síndrome de l'intestí irritable.

Figura 26: Termes utilitzats per descriure l'estat de la digestió de la lactosa. Font: Dominici et al. (2022).

La deficiència congènita de lactasa (DPC) és un trastorn genètic autosòmic recessiu que afecta la funció de la proteïna lactasa-florizina hidrolasa (LPH) a l'intestí, provocant la incapacitat de digerir la lactosa. La DPC està relacionada amb mutacions al gen LCT que poden ser homozigots o heterozigots compostes i afecten dominis crucials a LCT (Szilagyi, 2019). El silenciament epigenètic en la condició de LNP (intolerància a la lactosa) és causat per polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNP) en un potenciador ubicat a l'intró 13 del gen MCM6 del factor de llicència de replicació de l'ADN i a la regió promotora de LCT (Wanes et al., 2019).

Actualment, el 35% de la població adulta mundial presenta persistència a la lactasa, amb suficient capacitat de produir i mantenir nivells adequats de l'enzim lactasa a l'intestí prim durant l'edat adulta (Wanes *et al.*, 2019).

A la Figura 27 es mostra com funciona el tret genètic de la persistència de la lactasa (LP), el qual és autosòmic dominant i permet que els adults puguin digerir la lactosa. Encara que es coneixen diversos al·lells que confereixen LP, se'n desconeix la regulació i la base molecular. Aquests al·lells, que en concret en són 5, es troben en una regió de 100 parells de bases, dins de l'intró 13 del gen adjacent MCM6, i no al mateix gen LCT. Això fa que la lactasa segueixi sent expressada a l'edat adulta, mentre que el normal és que es reguli a la baixa després del deslletament. A més, s'ha identificat un altre al·lel a l'intró 9 de MCM6 que està relacionat amb el principal al·lel europeu associat a LP. Aquest polimorfisme millora l'expressió de lactasa, però només té efecte en presència del principal al·lel europeu (Szilagyi, 2019)

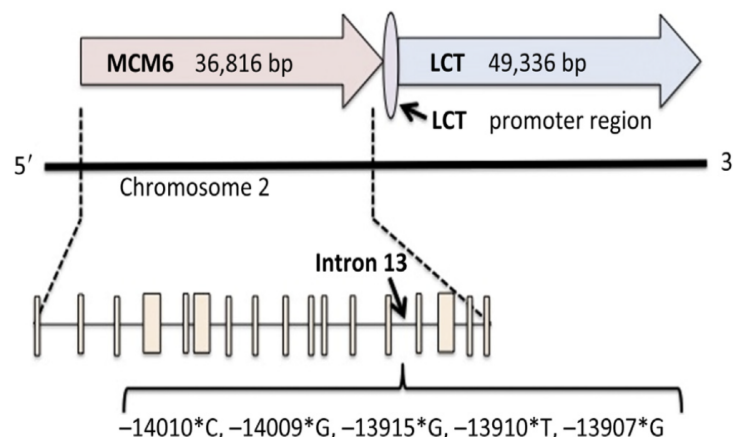


Figura 27: Dibuix esquemàtic dels gens LCT i MCM6 amb cinc al·lells de LP coneguts. Font: Szilagyi (2019).

La lactasa és diferent d'altres β -galactosidases presents en microorganismes i d'altres β -galactosidases humanes. Encara que hi ha diferències entre aquests enzims, en els éssers humans, la lactasa és la mateixa tant en individus hipolactàsics (amb intolerància a la lactosa) com en individus lactasa-persistents (que poden parir la lactosa a l'edat adulta). Si relacionem amb el punt explicat anteriorment, és important comprendre la variabilitat genètica en la població humana en relació amb la digestió de la lactosa, ja que la lactasa no és la causa de la intolerància a la lactosa, sinó que

les diferències en la capacitat per digerir la lactosa es deuen a altres factors genètics i reguladors que afecten l'expressió i producció de la lactasa (Estrada et al., 2014).

Hi ha quatre situacions principals en què la lactosa pot ser mal digerida. La primera és una condició estranya causada per mutacions genètiques recessives a l'enzim lactasa intestinal. La teràpia consisteix a evitar totes les formes de llet. La segona situació és la hipolactàsia d'inici en adults. La causa major sobre la mala digestió de la lactosa es relaciona amb aquesta forma. La tercera situació és la distribució de fenotips LP/LNP, on al nou món, les distribucions de LP/LNP depenen de la barreja de poblacions natives originals, i, més recentment, la migració de poblacions de països en desenvolupament al nou món. La quarta i última forma de mala digestió de la lactosa es relaciona amb malalties que causen la lesió de l'intestí prim, degut a que es perden les vellositats intestinals i es produeix una reducció de la lactasa intestinal (Dominici et al., 2022).

8.1.2 Com es diagnostica la intolerància a la lactosa

Per diagnosticar la intolerància a la lactosa, el metge pot fer diverses proves, com el test d'hidrogen expirat, el test de tolerància a la lactosa i el test genètic. Al test d'hidrogen expirat, s'administra una quantitat de lactosa i es mesuren els nivells d'hidrogen a la respiració per determinar la quantitat de lactosa que ha estat descomposta. Al test de tolerància a la lactosa, s'administra lactosa en una solució i es mesuren els nivells de glucosa en sang per determinar la quantitat de lactosa que ha estat descomposta. El test genètic pot identificar variants genètiques que s'associen amb la intolerància a la lactosa (Szilagyi i Ishayek, 2018).

8.1.3 Tractaments para la intolerància a la lactosa

Una preocupació important per a les institucions de salut és la possible deficiència de nutrients essencials en persones intolerants a la lactosa que eviten completament els productes lactis.

El calci i la vitamina D, per exemple, són nutrients essencials per al creixement i el manteniment ossi en nens i adults, respectivament. Els productes lactis proporcionen més calci, proteïnes, magnesi, potassi, zinc i fòsfor que qualsevol altre aliment típic de la dieta dels adults. Tot i que la intolerància a la lactosa és una condició real en resposta a la ingesta excessiva de lactosa, no necessàriament es deu exclusivament a la intolerància. D'aquesta manera, els tractaments per a la intolerància a la lactosa són específics i, en alguns casos, poden requerir teràpies addicionals si la reducció de lactosa no és suficient (Szilagyi i Ishayek, 2018).

Tots els humans no han de rebre necessàriament el mateix tractament per a la intolerància a la lactosa, ja que el tractament pot variar segons el grau d'intolerància, l'edat de la persona, la presència d'altres malalties o trastorns gastrointestinals i la preferència individual. Per tant, és important que cada persona amb intolerància a la lactosa rebi una avaluació individualitzada per un metge o nutricionista per determinar el tractament més adequat per al seu cas en particular (Szilagyi i Ishayek, 2018).

La majoria de persones amb aquesta afecció poden tolerar entre 12 i 15 g de lactosa al dia. Amb l'objectiu de millorar la nutrició, evitar deficiències i alleujar els símptomes, s'han desenvolupat estratègies per augmentar la tolerància als aliments que contenen lactosa. És important fomentar que les persones amb intolerància a la lactosa restringeixin la lactosa en lloc d'eliminar-la per complet, per poder incloure alguns productes lactis en la seva dieta i així obtenir beneficis dels nutrients que ofereixen, així com de la seva biodisponibilitat més gran. La indústria alimentària també pot contribuir millorant la informació que apareix a les etiquetes dels productes, indicant clarament el contingut de lactosa i evitant afirmacions enganyoses (Szilagyi i Ishayek, 2018).

Per altra banda, també trobem els substituïts no lactis. El consum de substituïts no lactis ha augmentat en els darrers anys, i els fabricants han augmentat la disponibilitat d'aquests productes. Aquests productes es deriven principalment de plantes com la soja, l'arròs, el cànem, la civada, el coco, l'ametlla i altres fruits secs. Aquests substituïts poden ser fortificats amb un o més nutrients com el calci, les vitamines D, A, B12 i riboflavina o no fortificats (Szilagyi i Ishayek, 2018)

A més, hi ha suplementes de lactasa disponibles al mercat que poden ajudar les persones intolerants a la lactosa a pair millor els aliments que contenen lactosa. Aquests suplementes es prenen abans dels àpats i proporcionen l'enzim lactasa que el cos no pot produir en quantitats suficients.

Per posar un exemple, l'empresa Intoleran Digestive Experts (Figura 28) ha creat productes com comprimits, càpsules i gotes que són fàcils d'utilitzar i ajuden a potenciar el sistema enzimàtic del cos per afrontar millor els aliments problemàtics i tornar a gaudir de l'experiència de menjar. Distribuïts per Intoleran Digestive Experts, consten de comprimits que contenen l'enzim lactasa, i que contribueix a la digestió de la lactosa en persones que tenen dificultats per pair-la. Els comprimits contenen 20.000 FCC de l'enzim lactasa i ajuden a pair grans quantitats de lactosa dels aliments. FCC es refereix a la quantitat d'activitat enzimàtica de la lactasa present a cada comprimit, un estàndard de mesurament utilitzat per determinar l'activitat enzimàtica als suplementes alimentaris. (Font: Intolerant.com)



Figura 28: Exemple de comprimits, suplementes, per ajudar a la digestió de la lactosa. (Font: Intolerant.com)

8.2 Al·lèrgia a les proteïnes de la llet

L'al·lèrgia alimentària correspon a l'absència, retard o cessament en l'adquisició de la tolerància immunològica davant d'un aliment. Està afavorida per factors genètics i ambientals. L'alimentació moderna i els canvis en els hàbits de consum intervenen en els nous aspectes de l'al·lèrgia alimentària. Així doncs, un al·lergen alimentari és una substància present en certs aliments que pot desencadenar una resposta al·lèrgica en algunes persones (Touhami i Kanny, 2022). No es pot ser al·lèrgic a la lactosa, ja que no és una proteïna, sinó un sucre. Aleshores, si és possible ser al·lèrgic a la proteïna de la llet. L'al·lèrgia a la proteïna de la llet és una reacció al·lèrgica a les proteïnes presents a la llet i productes lactis (Martorell et al., 2006).

La llet conté diverses proteïnes, entre elles les caseïnes, que són representen aproximadament el 80% de les proteïnes totals de la llet. Es troben en forma de micel·les que contenen calci i fòsfor. A la llet també s'hi troben altres proteïnes: proteïna del sèrum o la lactoglobulina que ajuden a protegir el cos contra infeccions, i que són les causants de les al·lèrgies en les persones (Martorell et al., 2006).

9. Legislació

En aquest apartat, es valorarà la legislació corresponent a l'ús de l'enzim lactasa i, per altra banda, la legislació corresponent als productes sense lactosa a nivell europeu.

9.1 La legislació corresponent a l'ús de l'enzim lactasa

La nova legislació europea sobre enzims alimentaris té com a objectiu principal garantir la protecció de la salut humana, protegir els interessos dels consumidors i eliminar els obstacles al mercat únic. Aquesta legislació forma part d'una reforma més àmplia que ha emprès la Comissió Europea per simplificar les regulacions existents relacionades amb additius alimentaris, aromes i enzims.

La Comissió Europea considera que la regulació nacional genera problemes de lliure circulació al mercat interior i pot dificultar la comprensió per part dels consumidors.

Per tant, s'ha proposat la creació d'una llista positiva harmonitzada a nivell europeu que inclourà tots els enzims alimentaris, incloent-hi també aquells que actualment estan autoritzats com a additius alimentaris, com la invertasa (E 1103) i el lisozim (E 1105).

Els enzims estan regulats mitjançant el Reglament (CE) núm. 1332/2008 del Parlament Europeu i del Consell, de 16 de desembre de 2008, sobre enzims alimentaris i pel qual es modifiquen la Directiva 83/417/CEE del Consell, el Reglament (CE) núm. 1493/1999 del Consell, la Directiva 2000/13/CE, la Directiva 2001/112/CE del Consell i el Reglament (CE) núm. 258/97. Aquest Reglament estableix normes sobre els enzims alimentaris utilitzats en els aliments, com els que s'utilitzen com a coadjuvants tecnològics, per assegurar el funcionament eficaç del mercat interior i harmonitza a escala comunitària les disposicions nacionals relatives a aquesta matèria. No inclou els enzims alimentaris destinats al consum humà, com els afegits per a fins de nutrició (Font: Gencat.cat, 2022).

Procediment d'autorització d'un enzim: S'hi poden trobar principalment tres reglaments.

1. Reglament (CE) 1331/2008 del Parlament Europeu i del Consell, de 16 de desembre de 2008, pel qual s'estableix un procediment d'autorització comú per als additius, els enzims i les aromes alimentàries.
2. Reglament (UE) 234/2011 de la Comissió, de 10 de març de 2011, d'execució del Reglament (CE) 1331/2008 del Parlament Europeu i del Consell, pel qual s'estableix un procediment d'autorització comú per als additius, les enzims i les aromes alimentàries. Implementa el procediment d'autorització comuna i va obrir un període, de l'11 de setembre del 2011 a l'11 de març del 2015, per presentar sol·licituds d'avaluació del risc d'enzims d'ús alimentari. El llistat de sol·licituds presentades està disponible a la web de la Comissió.
3. Reglament d'execució (UE) 562/2012 de la Comissió, de 27 de juny del 2012, pel qual es modifica el Reglament (UE) núm. 234/2011 de la Comissió pel que fa a la informació específica per a l'avaluació del risc dels enzims alimentaris,

que estableix excepcions a la presentació de les dades toxicològiques en alguns casos específics i la possibilitat d'agrupar els enzims alimentaris en virtut d'una sol·licitud amb determinades condicions.

El Reglament CE n.º 1332/2008 sobre enzims alimentàries harmonitza les disposicions sobre l'ús d'enzims alimentàries a la UE. Segons aquest Reglament, totes les enzims alimentaris han de ser aprovades per la Comissió Europea. Les enzims alimentaris aprovades s'inclouen a la llista d'enzims alimentaris de la UE (Font: EFSA, 2023).

Pel que fa a la legislació corresponent a l'ús de l'enzim lactasa, la normativa actual de la Unió Europea (UE) sobre enzims es basa en diversos actes legislatius, com la Directiva 89/107/CEE, que regula additius com la invertasa i la liozima; la Directiva 2001/112/CE, que regula els sucres de fruites i altres productes similars i els enzims utilitzats en ells; la Directiva 83/417/CEE, que regula les caseïnes i els caseïnats; i el Reglament (CE) núm. 1493/1999 sobre l'organització comuna del mercat vitivinícola, que estableix les condicions d'ús del liozim, la ureasa i β -glucanasa en la producció de vins (Font: EUR-lex Europa, 2020).

9.2 La legislació corresponent als productes sense lactosa a nivell Europeu

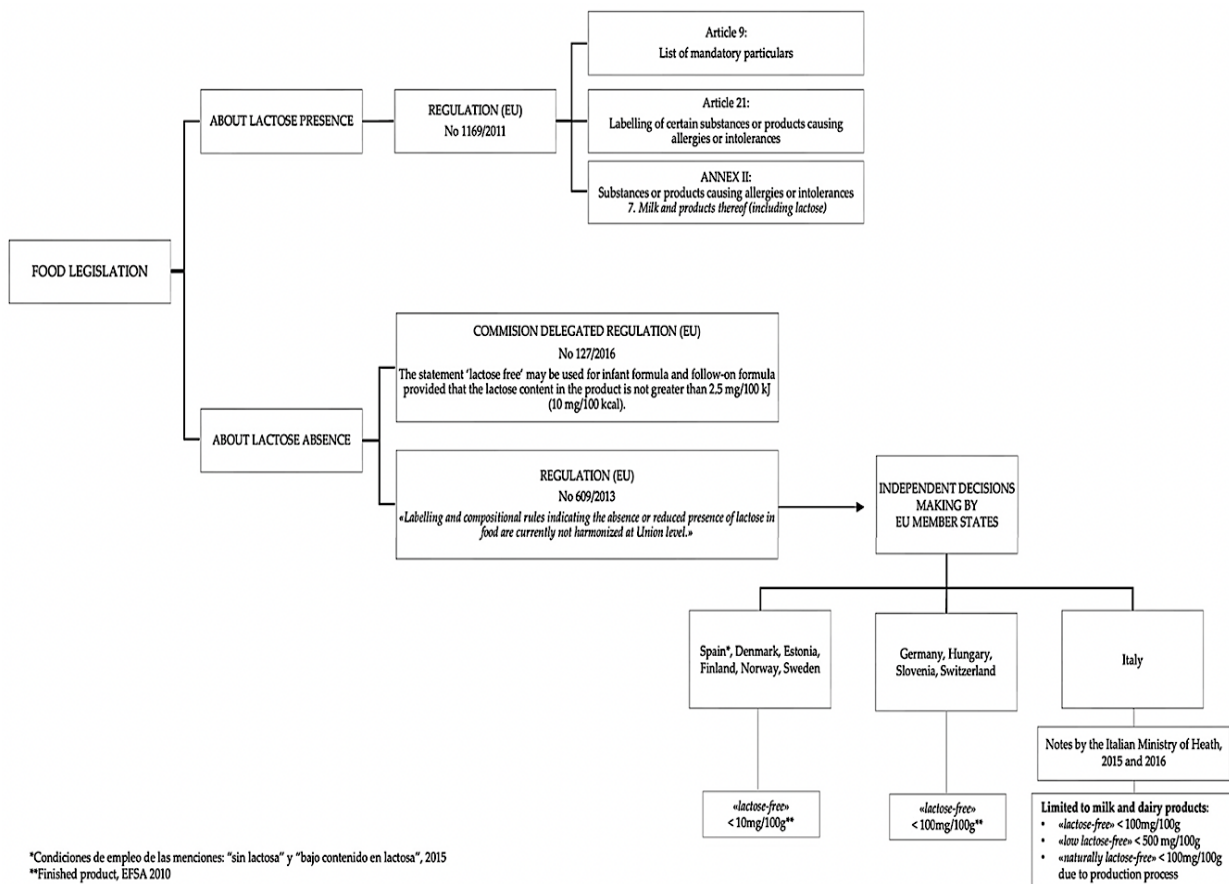
Els reglaments rellevants per a l'ús del terme "sense lactosa" en diferents productes alimentaris formen part del marc legal que garanteix la seguretat i l'autorització d'additius, enzims i aromes alimentaris a la Unió Europea, i han estat dissenyats per protegir la salut dels consumidors i assegurar la qualitat dels productes alimentaris comercialitzats al mercat europeu (Dominici et al., 2022). Fonamentalment, en trobem dos.

1. Reglament Delegat (UE) núm. 127/2016: Aquest reglament s'aplica específicament a la fórmula per a nadons i a la fórmula de continuació. Estableix que el terme "sense lactosa" es pot utilitzar per a aquests productes si el contingut de lactosa no supera els 2,5 mg/100 kJ o 10 mg/100 kcal. (Dominici et al., 2022).

2. Reglament (UE) núm. 609/2013: Aquest reglament menciona que les normes d'etiquetatge i composició que indiquen l'absència o la presència reduïda de lactosa en els aliments no estan harmonitzades a nivell de la Unió. En altres paraules, no hi ha una regulació unificada a nivell de la Unió Europea per a l'etiquetatge i la composició dels productes alimentaris que afirmen ser sense lactosa o tenir un contingut reduït de lactosa. (Dominici et al., 2022).

Cal tenir en compte que aquests reglaments són específics de la Unió Europea i potser no s'apliquen a altres regions o països. A més, les normatives d'etiquetatge dels aliments poden variar entre diferents jurisdiccions, per la qual cosa sempre és aconsellable consultar les regulacions específiques aplicables al teu país o regió.

A la Figura 28 s'hi troba un esquema sobre la legislació de aliments amb presència o absència de lactosa, actualitzat del 2022 (Dominici et al., 2022). Entre ells hi ha Espanya, on la quantitat de lactosa present per considerar un aliment lliure de lactosa és la inferior a 10 mil·ligrams per cada 100 grams de producte (<10mg/100g**).



*Condiciones de empleo de las menciones: "sin lactosa" y "bajo contenido en lactosa", 2015
**Finished product, EFSA 2010

Figura 28: Descripció general de la regulació sobre la lactosa en Europa. Font: Dominici et al. (2022).

Per una altra banda, l'etiquetatge de productes lactis alimentaris ha d'indicar clarament si contenen lactosa o si poden contenir traces de lactosa, ja sigui en productes com ara llet, formatges, embotits o medicaments. Seria prudent que el govern establís una legislació que definís clarament els termes "sense lactosa" i "lactosa reduïda", i que exigís que el contingut de lactosa aparegués en la informació nutricional dels productes (Szilagyi i Ishayek, 2018).

El Reglament (UE) núm. 609/2013 estableix que les normes d'etiquetatge i composició que indiquen l'absència o la presència reduïda de lactosa en els aliments no estan harmonitzades a nivell de la Unió Europea. Això vol dir que cada Estat membre de la Unió Europea té l'autonomia per prendre decisions independents en relació amb la regulació de la lactosa als aliments. (Szilagyi i Ishayek, 2018)

10. Conclusions

1. Els enzims són molècules orgàniques que actuen com a catalitzadors de reaccions químiques, és a dir, acceleren la velocitat de reacció. Tenen la capacitat de reduir l'energia d'activació requerida per a la reacció tot modificant la velocitat i l'eficiència de la reacció, de manera que disminueix l'energia necessària perquè la reacció ocorri.
2. La lactasa és un enzim que es troba dins del grup de les hidrolases, que catalitzen reaccions d'hidròlisi; concretament, és l'encarregada d'hidrolitzar la lactosa en glucosa i galactosa. Els residus Glu482 i Glu551 de la lactasa humana tenen un paper crucial en la catàlisi de la reacció.
3. La lactosa només es troba naturalment a la llet; la seva síntesi a partir de glucosa i galactosa té lloc a les glàndules mamàries dels mamífers gràcies a la lactosa sintasa.
4. En humans, la lactasa es troba a les cèl·lules del revestiment de l'intestí prim, majoritàriament en el jejú proximal, a les microvellositats de les cèl·lules epitelials que recobreixen la mucosa intestinal, on s'encarrega de descompondre la lactosa, en glucosa i galactosa per a la seva absorció al torrent sanguini.
5. La lactosa representa la principal font de substrat energètic per als lactants i nadons, presentant-se en proporcions variables segons l'espècie animal de la qual es recull la llet.
6. L'obtenció de lactosa per a aplicacions industrials es realitza a partir de la llet, principalment la de vaca, i del sèrum de la llet. S'obté a partir d'un procés d'extracció (filtració i centrifugació), concentració, cristallització (mitjançant processos de filtració o centrifugació), i finalment assecat.
7. En la indústria alimentària, la lactosa s'utilitza com a ingredient tecnofuncional. Els rols més rellevants de la lactosa a la indústria són com a edulcorant (pel seu gust dolç i s'utilitza com a substitut del sucre), agent d'enfosquiment no enzimàtic (produeixen sabors i colors desitjables en aliments), agent encapsulant (útil en el procés d'assecatge per atomització, degut a les propietats d'estabilitat i resistència

a la calor durant dit procediment), agent anticongelant (crioprotector), extensor de la vida útil i substrat de fermentació (en productes lactis com el iogurt i el quefir).

8. La lactosa també presenta alguns inconvenients a l'hora d'utilitzar com a ingredient tecno-funcional. La seva baixa solubilitat, és a dir, la seva facilitat per cristal·litzar provocant una textura sorrenca en els productes finals, la seva capacitat de participar en reaccions d'enfosquiment no enzimàtic, i la modificació de les propietats texturals en productes en pols que en continguin quan s'emmagatzemen en condicions d'humitat relativament elevada o altes temperatures, serien alguns aspectes a tenir en compte a l'hora d'aplicar aquest tipus de sucre en la producció.
9. Tot i que una part significativa de la població adulta mundial presenta persistència de lactasa, en la majoria dels humans i en altres mamífers, la producció de lactasa disminueix en algun moment entre la fi del període de lactància i l'edat adulta.
10. La freqüència d'intolerància a la lactosa en diferents poblacions sembla estar relacionada amb el consum de productes lactis. Així, aquelles poblacions amb una història limitada de consum de productes lactis tendeixen a presentar freqüències més elevades d'intolerància.
11. S'han identificat diversos polimorfismes (variacions) al gen de la lactasa (LCT) que afecta la producció de lactasa i que estan associats amb la intolerància a la lactosa en diferents poblacions. L'alta prevalença d'adults capaços de digerir la lactosa en zones nòrdiques és deguda a mutacions específiques en el gen LCT, que codifica la lactasa, i que permeten la producció contínua de l'enzim. Aquesta prevalença s'ha relacionat també amb la domesticació simultània de bacteris làctics, que converteixen la lactosa no digerible en àcid làctic d'absorció fàcil (millorar la digestibilitat de la lactosa).
12. La persistència de la lactasa en adults, es deu també a la mutació que produeix la persistència de la lactasa en adults de les societats lleteres, especialment aquelles del nord d'Europa i els seus descendents.

13. En els últims anys, la indústria alimentària s'ha transformat a causa del creixent consum de productes sense lactosa, impulsada per un augment d'individus amb intolerància a la lactosa, o aquells que simplement volen una dieta més saludable. Es pronostica un considerable creixement de la magnitud del mercat mundial de productes sense lactosa, i s'estima que aquest mercat continuarà expandint-se de manera significativa en els propers anys.
14. La producció de lactasa a nivell industrial té una aplicació directa en la indústria alimentària per a la producció de productes sense lactosa. Aquesta tecnologia implica l'ús de diferents fonts microbianes com llevats, fongs i bacteris per a la producció de lactasa a gran escala. Els microorganismes es cultiven en fermentadors i s'optimitzen les condicions de creixement per a estimular la producció de lactasa. Un cop obtingut el cultiu microbià, l'enzim se separa i purifica per a la seva utilització comercial.
15. Algunes de les fonts habitualment emprades per obtenir lactasa inclouen el llevat *Kluyveromyces lactis*, fongs com *Aspergillus niger* i *A. oryzae*, i bacteris com *Streptococcus thermophilus*. Aquests microorganismes produeixen lactasa en quantitats significatives.
16. Les lactases derivades d'*Aspergillus* spp són especialment adequades per a la hidròlisi de la lactosa en condicions àcides, mentre que les lactases de llevat funcionen millor a pH neutre.
17. Hi ha diverses tecnologies d'ús de lactasa en l'àmbit industrial, incloent-hi la tecnologia d'immobilització de lactasa i la tecnologia d'enginyeria genètica.
18. La tecnologia d'immobilització consisteix a fixar l'enzim en un suport sòlid, com ara una matriu o una membrana, augmentant la seva estabilitat i permeten així un ús més eficient i econòmic de lactasa, ja que es pot fer servir repetidament el mateix enzim sense haver de tornar a produir-lo en cada procés.

19. La presència d'aquest suport pot arribar a limitar la difusió de substrats i productes o afectar l'estructura tridimensional, l'accés al lloc actiu i/o el microambient de l'enzim; factors que alteren els seus paràmetres cinètics.
20. La tecnologia d'enginyeria genètica implica recombinar genèticament els microorganismes per a millorar la seva capacitat de produir lactasa. S'introdueixen gens que augmentin la producció d'enzims o que permetin als microorganismes produir lactasa en condicions òptimes. Això ajuda a augmentar l'eficiència i la quantitat de lactasa produïda, contribuint a una major disponibilitat dels productes sense lactosa.
21. Una de les grans recombinacions genètiques en el camp de la lactasa consisteix en construir soques recombinades de *Saccharomyces cerevisiae* amb el gen *lacA* procedent d'*Aspergillus niger*, i va donar resultat en una gran producció de quantitat de lactasa.
22. Per millorar el rendiment i la qualitat de l'enzim en l'àmbit d'enginyeria genètica, s'empren tècniques com la mutagènesi dirigida al lloc o la fusió de protoplasts.
23. Els productes sense lactosa més comercialitzats són la llet, el iogurt, el formatge i els gelats. L'addició de la lactasa en tots ells provoca l'efecte esperat: l'obtenció del producte sense lactosa.
24. Pel que fa a la llet sense lactosa, trobem dos processos principals: l'addició "a l'envàs" i l'addició "en lot". En el primer procés l'enzim es troba actiu dins l'envàs, i en el segon l'enzim s'inactiva durant l'esterilització. En la producció del iogurt, la lactasa s'hi afegeix abans de l'acidificació per evitar problemes d'acidesa excessiva i garantir un iogurt de sabor i textura millor. En el formatge, és essencial incubar la llet abans de la coagulació juntament amb l'enzim i en els gelats, la clau està en afegir l'enzim després de la pasteurització i incubació i abans de la congelació. L'addició de lactasa a nivell de formulació requereix una vigilància adequada.
25. És important considerar diversos factors, com ara la dosificació adequada de la lactasa per garantir una hidròlisi eficient de la lactosa i les condicions de

temperatura i pH òptimes perquè l'activitat de la lactasa sigui estable durant el procés de formulació. A més, s'han de tenir en compte possibles interaccions amb altres ingredients de la formulació que puguin afectar l'activitat de la lactasa.

26. A més de les alternatives alimentàries per a les persones intolerants a la lactosa, hi ha algunes opcions no alimentàries que poden ser útils per satisfer les necessitats dels que no poden consumir productes lactis que continguin lactosa. Els suplementes de lactasa estan disponibles en forma de tauletes o càpsules i contenen l'enzim lactasa. Prendre aquests suplementes abans de consumir productes lactis pot ajudar a descompondre la lactosa i reduir els símptomes d'intolerància.

11. Bibliografía

AcademiaLab. (s. f.). Beta-galactosidasa. <https://academia-lab.com/enciclopedia/beta-galactosidasa/>. Data d'última consulta: 14 d'abril del 2023.

Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (s. f.). https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/enzimas_alimentarias.htm

ARROYO, D. M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* (Internet), 39(2), 23–39. Recuperado a partir de <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/6008>

Almasi, H., Jahanbakhsh Oskouie, M., & Saleh, A. (2021). A review on techniques utilized for design of controlled release food active packaging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(15), 2601-2621. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2020.1783199>. PMID:32588646.

ARROYO, D. M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* (Internet), 39(2), 23–39. Recuperado a partir de <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/6008>

Baret, J. L. (1987). Large-scale production and application of immobilized lactase. En: *Methods in Enzymology* (pp. 411-423). [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(87\)36040-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(87)36040-9)

Bello, A. (2009). Producción de enzimas en la industria láctea (lactasa y renina). Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zipaquira.

Biblioteca Nacional de Medicina | USAGov. (s. f.). <https://www.usa.gov/es/agencias/biblioteca-nacional-de-medicina>

BIOLAN HEALTH. (2021). ¿Qué es realmente la intolerancia a la lactosa? - BIOLAN HEALTH. <https://biolanhealth.com/es/que-es-realmente-la-intolerancia-a-la-lactosa/>.
Data d'última consulta: 15 de març de 2023

De Albuquerque, T. L., De Sousa, M., Silva, N. C. G. E., Neto, C. P., Gonçalves, L. R. B., Fernandez-Lafuente, R., & Rocha, M. J. (2021). β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 881-898. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133>

De Oliveira, C., Guimarães, P. M. R., i Domingues, L. (2011). Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 600-609. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.008>

Dekker, P., Koenders, D. J. P. C., & Bruins, M. J. (2019b). Lactose-Free Dairy Products: Market Developments, Production, Nutrition and Health Benefits. *Nutrients*, 11(3), 551. <https://doi.org/10.3390/nu11030551>

Dekker, P., Koenders, D. J. P. C., i Bruins, M. J. (2019). Lactose-free dairy products: Market developments, production, nutrition and health benefits. *Nutrients*, 11(3), 551. <https://doi.org/10.3390/nu11030551>

Directrices | CODEXALIMENTARIUS FAO-WHO. (s. f.). <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/es/>

Domingues, L., Onnela, M. L., Teixeira, J. A., Lima, N., & Penttilä, M. (2000). Construction of a flocculent brewer's yeast strain secreting *Aspergillus niger* beta-galactosidase. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(1), 97–103. <https://doi.org/10.1007/s002530000358>

Dominici, S., Marescotti, F., Sanmartin, C., Macaluso, M., Taglieri, I., Venturi, F., Zinnai, A., i Facioni, M. S. (2022). Lactose: Characteristics, food and drug-related

applications, and its possible substitutions in meeting the needs of people with lactose intolerance. *Foods*, 11(10), 1486. <https://doi.org/10.3390/foods11101486>

Ebc, i Ebc. (2023). Enzyme Immobilization: Method & Application | EasyBiologyClass. EasyBiologyClass | Biology Notes, PDFs, PPTs, MCQs and Old Question Papers. https://www.easybiologyclass.com/enzyme-cell-immobilization-techniques/?utm_content=cmp-true Data d'última consulta: 3 d'abril del 2023

Estrada, M. I. C., Baltazar, R. G., Cortés, S. G. L., Rodríguez, G. C., i Santacruz, G. H. (2014). Health self-care in informal sector female workers in Guadalajara (Mexico). A gender perspective. *Salud*, 30(1), 1-9. <https://doi.org/10.14482/sun.30.1.4309>

Farahnak, F., Seki, T., Ryu, D. D. Y., & Ogrydziak, D. M. (1986). Construction of lactose assimilating and high-ethanol-producing yeasts by protoplast fusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), 362-367. <https://doi.org/10.1128/aem.51.2.362-367.1986>

Farahnak, F., Seki, T., Ryu, D. D. Y., & Ogrydziak, D. M. (1986b). Construction of Lactose-Assimilating and High-Ethanol-Producing Yeasts by Protoplast Fusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), 362-367. <https://doi.org/10.1128/aem.51.2.362-367.1986>

Fassio, F., Facioni, M. S., & Guagnini, F. (2018). Lactose Maldigestion, Malabsorption, and Intolerance: A Comprehensive Review with a Focus on Current Management and Future Perspectives. *Nutrients*, 10(11), 1599. <https://doi.org/10.3390/nu10111599>

Fiore, A., Bandini, E., De Donno, R., Meijer, G., Trezzi, M. M., & Fogliano, V. (2016). The quality of low lactose milk is affected by the side proteolytic activity of the lactase used in the production process. *Food Research International*, 89, 514-525. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.021>

Goddard, J. M., & Hotchkiss, J. H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32(7), 698-725. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002>

Grace K. J., Yuiry, H., and Kim, L. (2017) Production Technology of Lactase and Its Application in Food Industry Application. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1(1), 4-6 <https://doi.org/10.26855/jsfa.2017.01.002>

Hettinga, K. A. (2019). Lactose in the dairy production chain. *Lactose*, 231-266. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811720-0.00006-4> Data d'última consulta: 10 d'abril del 2023

Horner, T., Dunn, M., Eggett, D., & Ogden, L. (2011). β -Galactosidase activity of commercial lactase samples in raw and pasteurized milk at refrigerated temperatures. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3242-3249. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3742>

Intoleran. (2023, 14 marzo). Lactasa 20.000 - 50 comprimidos | Intoleran España. Intoleran España. https://www.intoleran.com/es/product/lactasa-20-000-50-comprimidos/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=18466040148&utm_agid=&utm_term=&creative=&device=c&placement=&gclid=Cj0KCQjw9deiBhC1ARIsAHLjR2CEz01NvLx5Qtadwyl35PWdRI0VpgYs1XHEmAAcCFYx6G8uokHAAR8aAjqDEALw_wcB Data d'última consulta: 25 de d'abril del 2023

James, J. A., & Simpson, B. K. (1996). Application of enzymes in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(5), 437-463. <https://doi.org/10.1080/10408399609527735>

Khan, U., & Selamoglu, Z. (2020). Use of Enzymes in Dairy Industry: A Review of Current Progress. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*. <https://doi.org/10.22092/ari.2019.126286.1341>

Kilara, A., & Shahani, K. (1976). Lactase Activity of Cultured and Acidified Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 59(12), 2031-2035. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(76\)84484-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(76)84484-0)

Lambré, C., Baviera, J. M. B., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Rivière, G., Steffensen, I.,

Tlustos, C., Van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., Aguilera, J., Cavanna, D., De Sousa, R., . . . Chesson, A. (2022). Safety evaluation of the food enzyme β -galactosidase from the genetically modified *Aspergillus niger* strain TOL. *EFSA Journal*, 20(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7570>

Lambré, C., Baviera, J. M. B., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Rivière, G., Steffensen, I., Tlustos, C., Van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., Aguilera, J., Cavanna, D., De Sousa, R., . . . Chesson, A. (2022b). Safety evaluation of the food enzyme β -galactosidase from the genetically modified *Aspergillus niger* strain TOL. *EFSA Journal*, 20(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7570>

Legislación de las enzimas alimentarias. (s. f.-b). Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. https://acsa.gencat.cat/es/seguretat_alimentaria/seguretat_alimentaria_per_temes/enzims_alimentaris/legislacio/index.html

Legislación de las enzimas alimentarias. (s. f.). Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria.

https://acsa.gencat.cat/es/seguretat_alimentaria/seguretat_alimentaria_per_temes/enzims_alimentaris/legislacio/index.html Data d'última consulta: 31 de maig de 2023
LLIURAMENT 3: Biotecnologia: Enginyeria genètica. (s. f.-b). <https://educaciodigital.cat/ioc-batx/moodle/mod/book/view.php?id=3705&chapterid=2661> Data d'última consulta: 20 d'abril del 2023

LOMER, M. C. E., PARKES, G. C., & SANDERSON, J. D. (2007). Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2), 93-103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x>

Lomer, M., Parkes, G., & Sanderson, J. D. (2007). Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2), 93-103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x>

María, J. (s. f.). LA LECHE «SIN LACTOSA» SÍ LLEVA LACTOSA. <http://www.alimentologiacruda.es/2016/03/la-leche-sin-lactosa-si-lleva-lactosa.html>

Data d'última consulta: 25 de maig del 2023

Marten, L. M., Wanes, D., Stellbrinck, T., Santer, R., & Naim, H. Y. (2022b). Hypomorphic variants of lactase-phlorizin hydrolase in congenital lactase deficiency are trafficking incompetent and functionally inactive. *Biochimica Et Biophysica Acta: Molecular Basis Of Disease*, 1868(4), 166338. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166338>

Martorell, A., Plaza, A., Boné, J., Nevot, S., Ara, M. C. G., Echeverría, L. E., Alonso, J. L., Garde, J., Vila, B., Alvaro, M., Tauler, E., Hernando, V., & Fernández, M. (2006). Cow's milk protein allergy. A multi-centre study: clinical and epidemiological aspects. *Allergologia et immunopathologia*, 34(2), 46-53. <https://doi.org/10.1157/13086746>

McLaughlin, K., PhD. (2020). Active Site. *Biology Dictionary*. <https://biologydictionary.net/active-site/> Data d'última consulta: 25 de maig del 2023
Milk Substitutes Non dairy milk Market Size, Trends and Global Forecast To 2032. (s. f.). <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/milk-substitutes-non-dairy-milk-global-market-report>

Motta, J. F. G., De Freitas, B. C. B., De Almeida, A. F., De Souza Martins, G. A., & Borges, S. V. (2023). Use of enzymes in the food industry: a review. *Food Science and Technology*, 43. <https://doi.org/10.1590/fst.106222>

Movahedpour, A., Ahmadi, N., Ghalamfarsa, F., Ghesmati, Z., Khalifeh, M., Maleksabet, A., Shabaninejad, Z., Taheri-Anganeh, M., & Savardashtaki, A. (2021). β -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(2), 612-628. <https://doi.org/10.1002/bab.2137>

Movahedpour, A., Ahmadi, N., Ghalamfarsa, F., Ghesmati, Z., Khalifeh, M., Maleksabet, A., Shabaninejad, Z., Taheri-Anganeh, M., & Savardashtaki, A. (2021b). β -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form.

Biotechnology and Applied Biochemistry, 69(2), 612-628.
<https://doi.org/10.1002/bab.2137>

Nelson, D., & Cox, M. M. (2016). Principles Biochem 7e (International Ed). New York, USA.

Nguyen, H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. Applied Science and Convergence Technology, 26(6), 157-163.
<https://doi.org/10.5757/asct.2017.26.6.157>

Oliveira, C., Guimarães, P. M., & Domingues, L. (2011). Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. Biotechnology advances, 29(6), 600–609.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.008>

Ozatay, S. (2020). Recent Applications of Enzymes in Food Industry. Journal of current researches on engineering, science and technology.
<https://doi.org/10.26579/jocrest.52>

Panawala, L. (2017). What is the Active Site of an Enzyme. ResearchGate.
https://www.researchgate.net/publication/318305481_What_is_the_Active_Site_of_a_n_Enzyme Data d'última consulta: 15 de maig del 2023

Pereira-Rodríguez, Á., Fernandez-Leiro, R., González-Siso, M., Cerdán, M. E., Becerra, M., & Sanz-Aparicio, J. (2012). Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. Journal of Structural Biology, 177(2), 392-401.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.031>

Popova, A., & Mihaylova, D. (2019). Antinutrients in Plant-based Foods: A Review. The Open Biotechnology Journal, 13(1), 6876.
<https://doi.org/10.2174/1874070701913010068>

Primeras preguntas - Lactosa. (2022, 14 diciembre). Lactosa. <https://lactosa.org/la-intolerancia/primeras-preguntas/> Data d'última consulta: 29 de maig del 2023

Production Technology of Lactase and Its Application in Food Industry Application. (2017). The Journal of the Science of Food and Agriculture, 1(1). <https://doi.org/10.26855/jsfa.2017.01.002>

Robaina, L. M., Aragüez-Forte, Y., & Pino, J. A. (2019). La transición vítrea en relación con la pegajosidad en el secado por aspersion: Glass transition in relation to stickiness during spray drying. *Ciencia Y Tecnología De Alimentos*, 29(3), 62–69. Recuperado a partir de <https://www.revcitecal.iiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/article/view/78>
Data d'última consulta: 10 d'abril de 2023

Rodríguez Martínez, D., & Pérez Méndez, L. F.. (2019). Intolerancia a la lactosa. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 98(2), 143. Data d'última consulta: 30 de maig del 2023. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082006000200009&lng=es&tlng=es.

Rodriguez, D. (2015). Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* Trabajo Fin de Grado. Universida de da Coruña.

Romero-Velarde, E., Delgado-Franco, D., García-Gutiérrez, M., Gurrola-Díaz, C., Larrosa-Haro, A., Montijo-Barrios, E., Muskiet, F. A. J., Vargas-Guerrero, B., & Geurts, J. (2019b). The Importance of Lactose in the Human Diet: Outcomes of a Mexican Consensus Meeting. *Nutrients*, 11(11), 2737. <https://doi.org/10.3390/nu11112737>

Sandarani, M., & Kulathunga, K. A. A. V. (2019). A Brief Review: Lectins, Protease Inhibitors and Saponins in Cereals and Legumes. *Asian Food Science Journal*, 1-4. <https://doi.org/10.9734/afsj/2019/v10i430044>

Santillán-Doherty, P., Grether-González, P., De Jesús Medina-Arellano, M., Chan, S., Tapia-Ibargüengoitia, R., Brena-Sesma, I., La Fuente, R. C., Linares-Salgado, J., Mendoza-Cárdenas, H., Muñoz-Fernández, L., & Schiavon, R. (2019). Reflexiones sobre la ingeniería genética: a propósito del nacimiento de gemelas sometidas a edición génica. *Gaceta Medica De Mexico*, 156(1). <https://doi.org/10.24875/gmm.19005182>

Skovbjerg, H., Sjöström, H., & Norén, O. (1981). Purification and characterisation of amphiphilic lactase/phlorizin hydrolase from human small intestine. *European Journal of Biochemistry*, 114(3), 653-661. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05193.x>

Soluciones SL, S. D. (s. f.-b). RAPD Online | SAPD | Sociedad Andaluza de Patología Digestiva. <https://www.sapd.es/revista/2019/42/5/01> Data d'última consulta: 13 d'abril de 2023

Steve Young i Bruce Tharp (2006), How Do Enzymes Affect Production and Quality of Ice Cream? *Diary Food* <https://www.dairyfoods.com/articles/85133-how-do-enzymes-affect-production-and-quality-of-ice-cream> Data d'última consulta: 15 de maig del 2023

Suri, S., Kumar, V., Prasad, R., Tanwar, B., Goyal, A., Kaur, S., Gat, Y., Kumar, A., Kaur, J., & Singh, D. (2019). Considerations for development of lactose-free food. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 15, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.jnim.2018.11.003>

Suri, S., Kumar, V., Rasane, P., Tanwar, B., Goyal, A., Kaur, S., Gat, Y., Kumar, A., Kaur, J., & Singh, D. (2019). Considerations for development of lactose-free food. *Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism*, 15, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.jnim.2018.11.003>

Szilagyi, A. (2019). Digestion, absorption, metabolism, and physiological effects of lactose. *Lactose*, 49-111. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811720-0.00002-7>

Szilagyi, A., & Ishayek, N. (2018). Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. *Nutrients*, 10(12), 1994. <https://doi.org/10.3390/nu10121994>

Szilagyi, A., Walker, C., & Thomas, M. G. (2019). Lactose intolerance and other related food sensitivities. *Lactose*, 113-153. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811720-0.00003-9>

Touhami, M. K., & Kanny, G. (2022). Alergias alimentarias. EMC - Tratado de Medicina. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(22\)47168-6](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(22)47168-6)

Touhami, M. K., & Kanny, G. (2022b). Alergias alimentarias. EMC - Tratado de Medicina. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(22\)47168-6](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(22)47168-6)

Walker, C., & Thomas, M. G. (2019). The evolution of lactose digestion. Lactose, 1-48. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811720-0.00001-5>

Wanes, D., Husein, D. M., & Naim, H. Y. (2019). Congenital Lactase Deficiency: Mutations, Functional and Biochemical Implications, and Future Perspectives. *Nutrients*, 11(2), 461. <https://doi.org/10.3390/nu11020461>

Wanes, D., Husein, D., & Naim, H. (2019). Congenital Lactase Deficiency: Mutations, Functional and Biochemical Implications, and Future Perspectives. *Nutrients*, 11(2), 461. <https://doi.org/10.3390/nu11020461>

Wang, Z., Qi, J., Hinkley, T. C., Nugen, S. R., & Goddard, J. M. (2021). Recombinant lactase with a cellulose binding domain permits facile immobilization onto cellulose with retained activity. *Food and Bioprocess Processing*, 126, 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.01.010>

Wong, D., & Goddard, J. M. (2014). Short communication: Effect of active food packaging materials on fluid milk quality and shelf life. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7214>

Wong, D., Talbert, J. N., & Goddard, J. M. (2013). Layer by Layer Assembly of a Biocatalytic Packaging Film: Lactase covalently Bound to Low-Density Polyethylene. *Journal of Food Science*, 78(6), E853-E860. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12134>

Xavier, J. R., Ramana, K. V., & Sharma, R. K. (2018b). β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. *Journal of Food Biochemistry*, 42(5), e12564. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>

Zerva, A., Limnaios, A., Kritikou, A. S., Thomaidis, N. S., Taoukis, P., & Topakas, E. (2021). A novel thermophile β -galactosidase from *Thermothielavioides terrestris* producing galactooligosaccharides from acid whey. *New Biotechnology*, 63, 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.03.002>

Zimmermann, B. H. (2020b). Efecto sinérgico de la modificación genética e inmovilización de enzimas microbianas en la cinética de procesamiento de alimentos. Universidad de los Andes. <http://hdl.handle.net/1992/51313>

Zou, S., He, X., Liu, Y., Chen, D., Luo, Y., Huang, K., Zhang, W., & Xu, W. (2014). Toxicological evaluation of lactase derived from recombinant *Pichia pastoris*. *PLoS one*, 9(9), e106470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106470>

ARROYO, D. M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* (Internet), 39(2), 23–39. Recuperado a partir de <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/6008>